

UNIVERSITÉ DE PARIS — FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNEE 1970 - 1971

SERIE U - N°

THÈSE

PRÉSENTÉE À LA

FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR L'OBTENTION DU

TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

P A R

PARVINE - BAYAT

PHARMACIEN

INFLUENCE DU MILIEU SUR L'ACTIVITÉ BACTÉRIOSTATIQUE DES SUBSTANCES ANTIBACTÉRIENNES

SOUTENUE LE 8 JANVIER 1971, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

JURY : M^{lle} S. LAMBIN

PRÉSIDENT

M. A. DESVIGNES

M. J. BORT

EXAMINATEURS

UNIVERSITÉ DE PARIS — FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNEE 1970 - 1971

SERIE U - N°

THÈSE

PRÉSENTÉE À LA

FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR L'OBTENTION DU

TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

P A R

PARVINE - BAYAT

PHARMACIEN

INFLUENCE DU MILIEU SUR L'ACTIVITÉ BACTÉRIOSTATIQUE DES SUBSTANCES ANTIBACTÉRIENNES

SOUTENUE LE 8 JANVIER 1971, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

JURY : M^{elle} S. LAMBIN
M. A. DESVIGNES
M. J. BORY

PRÉSIDENT

EXAMINATEURS

Digitized by the Internet Archive
in 2026



PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS.

ADMINISTRATION

M.	QUEVAUVILLER A.		Doyen, président du Conseil transitoire de Gestion
M.	GUIGNARD J-L		Assesseur
M.	RODINEAU L.	+.....	Secrétaire Général
Mme	FERRARI.S.		Attaché Principal d'Adminis- tration Universitaire Adjointe au Secrétaire Général
M.	BRENN A.	+.....	Attaché Principal d'Intendance Universitaire
M.	JEANDEL L.		Attaché d'Administration Universitaire
M.	JACOB A.	+.....	Attaché d'Administration Universitaire
Mlle	FRIZOL E.		Attaché d'Administration Universitaire

DOYENS HONORAIRES

M.	VALETTE Guillaume	O+
M.	MALANGEAU Pierre	

PROFESSEURS HONORAIRES

M.	IAUNOY L.		O+
M.	FLEURY P.		O+
M.	PICON M.		O+

PROFESSEURS

M.	JANOT M-M	O+Membre de l'Institut ..	Pharmacie galénique (T)
M.	VALETTE G.	O+.....	Pharmacodynamie (T)
M.	PARIS R.	O+.....	Matière médicale (T)
M.	GUILLOT M.	O+.....	Physique (T)
M.	GAUTIER J-A	O+.....	Chimie organique (T)

Melle	LAMBIN S.	+	Microbiologie (T)
M.	RAOUL Y.	+	Physiologie (T)
M.	COURTOIS J.	+	Chimie biologique (T)
M.	DOMANGE L.	O+	Chimie générale et minérale (T)
M.	TRUHAUT R.	C+	Membre de l'Institut Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
M.	MORETTE A.	+	Hydrologie (T)
M.	CAVIER R.	+	Parasitologie (T)
M.	QUEVAUVILLER A.	+	Hygiène et Education sanitaire (T)
M.	MOREAU R.	+	Pharmacie chimique (T)
M.	GERMAN A.		Microbiologie (T)
M.	PIETTE M.	+	Hématologie (T)
M.	MALANGEAU P.		Chimie analytique (T)
M.	GIRARD M.	+	Biochimie appliquée (T)
M.	DILLEMANN G.		Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
M.	DEYSSON G.	+	Botanique (T)
M.	FLAHAUT J.		Minéralogie (T)
M.	RENAULT J.		Chimie organique (T)
M.	LE HIR A.		Pharmacie galénique (T)
M.	BOUDENE C.		Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
M.	LARUELLE P.		Physique (T)
M.	ROSSIGNOL P.		Pharmacodynamie (T)
M.	MANGEOT A.		Pharmacie galénique industrielle (T)
M.	DELAVEAU P.		Sémiologie et Pathologie générale (T)
M.	COHEN Y.		Pharmacodynamie (T)
M.	RENAULT H.		Physique (T)
M.	BOURDON R.		Chimie analytique (T)
M.	REYNAUD P.		Pharmacie chimique (T)
M.	LE MOAN R.		Toxicologie
M.	POISSON J.		Pharmacie galénique
M.	MICHEL R.		Endocrinologie (T)

M.	LECLERC M.		Hématologie
M.	PERCHERON F.		Chimie biologique
M.	SAVEL J.		Biologie animale
M.	DESVIGNES A.		Cryptogamie et Technique bactériologique
M.	MIOCQUE M.		Chimie organique

MAITRES DE CONFERENCES

M.	PAOLETTI C.		Toxicologie (T)
M.	BORY J.		Microbiologie (T)
M.	GUIGNARD J-L		Botanique générale (T)
M.	GOUFFELLE J-C		Physiologie (T)
M.	BINET P.		Biologie animale (T)
M.	COMBET-FARNOUX C.		Chimie organique
M.	PLAT M.		Chimie analytique (T)
Mme	PLAT M.		Législation et Déontologie pharmaceutique (T)
M.	DELACOUX E.		Pharmacie chimique (T)
M.	CAVE A.		Matière médicale (T)
M.	PUISIEUX F.		Pharmacie galénique (T)
M.	DUCHON D'ENGENIERES M.		Chimie organique (T)
M.	ADOLPHE C.		Physique (T)
M.	GUERNET M.		Chimie analytique (T)
M.	DIDRY J.		Mathématiques appliquées au Sciences expérimentales (T)
M.	KHODADAD P.		Chimie minérale (T)
M.	PERLES R.		Chimie biologique (S)
M.	LEMONNIER A.		Biochimie appliquée (S)
M.	YONGER J.		Chimie analytique (S)
M.	HAMON M.		Chimie analytique (S)
M.	MESTRE J.		Botanique (S)
M.	AGNERAY J.		Biologie (S)
M.	DREUX C.		Biochimie appliquée (S)
M.	RIVET J.		Chimie générale et minérale (S)
M.	ETIENNE J.		Mathématiques (S)
M.	HAZEBROUCQ G.		Physique (S)
M.	ROUSSELET F.		Biochimie appliquée (S)
M.	BOURRINET P.		Hygiène (S)
M.	SOULEAU Ch.		Chimie générale et minérale (S)
Mme	HUBERT J.		Microbiologie (délég.)
Mlle	BOURNIQUE C.		Botanique (délég.)

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

M. GESTEAU P. +
M. GUERIN H. +
Mme HARISPE M.
Mlle LONGUEVALLE S.
M. HARISPE +

MAITRES-ASSISTANTS et CHEFS de TRAVAUX

M. ANDRE Guy TP Pharmacie galénique
2-3e A (délég.)
M. ADAM Yves TP Pharmacie chimique 5e A
(Synthèse médicaments (T)
M. AYMARD Pierre ED Physiologie-Histologie
(T)
Mlle BARNIER S. Mathématiques (délég)
Mlle BENOIS Martine TP Botanique 2e A. (délég.)
Mlle BERNARD J. TP Bactériologie 5e A
Industrie (T)
M. BESANCON Pierre Mathématiques (S)
Mme BLANC Jeanine ED Chimie organique 1-2 A
(T)
Mme BONALY J. ED Botanique 1 A (délég.)
Mme BOSIO A-Marie TP Chimie qualitative
(délég.)
M. BOURLIOUX Pierre CES Bactériologie (délég)
M. CAILLARD Claude TP Pharmacodynamie 4-5 A
(délég)
M. CANAL Jacques ED et TP Biochimie appli-
quée 5 A - Biologie offi-
cine (délég)
M. CARRE Daniel Mathématiques (délég)
Mlle CARRERE Clothilde TP Microbiologie 4 A (T)
Mme CENAC Jacqueline CES Parasitologie (T)
Mme CHARDENOT P. Chimie biologique 3-4 A(T)
Mme CHARPENTIER M. ED Chimie générale et mi-
nérale 1ère A (T)

M.	CHERON J-Marie		TP Chimie biologique 3-4 (délég)
Mlle	CLAIR Geneviève		ED Matière médicale 3-5 (T)
M.	DAGRON Christian		ED Chimie générale et miné- rale 2 A (T)
M.	DAVY Jean		CES Biochimie (délég)
M.	DEBRAY M.		Mathématiques (délég)
Mlle	DECAUDIN M-Thérèse		TP Parasitologie 4 A (T)
M.	DELATTRE Jacques		CES Electrochimie et TP 5 Biologie (délég)
M.	DELCOURT Alain		ED Botanique 2 A (délég)
M.	DOUSSIN Alexandre		TP Chimie analytique 5 A
Mlle	DUCHENE Dominique		CES Pharmacie galénique in- dustrielle (délég)
Mlle	DUMANT Geneviève		CES Analyse physico-chimie des médicaments (T)
Mme	DUPONT Charlotte		CES Pharmacodynamie (T)
M.	ETIENNE Guy		TP Pharmacie galénique 2-3 (T)
Mme	FAURE Liliane		ED Chimie organique 1-2 A
Mlle	FLEURY Solange		ED Chimie analytique quan- titative (T)
Mlle	FOGLIETTI M-José		TP Chimie biologique 3-4 A (T)
M.	GAIRARD Alexis		CES Contrôle médicaments (biologie) (délég)
M.	GAYRAL Philippe		TP Zoologie 1 A (délég)
Mme	BOY Françoise		Mathématiques (délég)
M.	GIRARDEAU J-F		TP Chimie organique 5 A (synthèse organique) (délég)
M.	GOBERT Jean		TP Zoologie 1 A (S)
Mlle	GOURSAT M-José		ED Botanique 1 A (T)
M.	GROSSIORD J-Louis		TP Physique 1 A (délég)
Mlle	GUILLOUX Edith		TP Chimie biologique 3-4 A (S)
M.	HENRY Jacques		Essais médicaments chimiques et galéniques (T)
Mme	JULIEN Maud		ED Physique 2 A (T)
M.	JULIEN René		ED Chimie minérale 1 A (T)

Mlle	JUND Yvonne		CES Microbiologie et contrôle médicaments - microbiologie(T)
M.	LALEGERIE Pierre		CES Biologie (S)
M.	LAROCHE Jacques		TP 5 A - Secourisme - Hygiène Education sanitaire (T)
Mme	LEDUC Yvette		TP Chimie analytique quali- tative (T)
M.	LEGENDRE Lucien		TP Chimie organique 2 A
Mme	LEGER Nicole		Parasitologie 5 A (T)
M.	LELUC Robert		CES Bactériologie (T)
M.	LEMAY René		CES Législation (T)
Mme	LE QUANG THUAN		TP Chimie analytique qualit. (S)
M.	LEVILLAIN Pierre		ED Chimie analytique qualit. (T)
Mme	LEVY Françoise		ED Botanique 2 A (délég)
M.	LIKFORMAN Joseph		ED Physique 1 A (T)
Mlle	LONGEVIALLE M.		ED Botanique 1 A (T)
M.	MAHUZIER Georges		TP Chimie analytique quantit. (T)
M.	MANDEREAU Jean		CES Pharmacotechnie chimique (T)
M.	MANET Léon		CES Biochimie (T)
M.	MARTIN-FRERE H.		TP Chimie générale et miné- rale 1ère A (T)
M.	MAUCUIN Yves		Mathématiques (délég)
Mme	MAYRARGUE Joëlle		ED Chimie organique 1-2 A (délég)
Mlle	MICHELET Annick		ED Chimie générale et miné- rale 2 A (T)
M.	MOULIN Pierre		P Physique 1 A(délég)
Mme	MOURY Jacqueline		TP Zoologie 1 A (S)
Mme	NOTTEGHEM M-J		ED Parasitologie 4 A (T)
M.	NGUYEN Phu Lich		CES Toxicologie (délég)
Mme	PANOUSE Jacqueline		CES Microbiologie - Virologie- Immunologie (T)
Mme	PAOLAGGI Françoise		CES Electrochimie et TP 5 A Biologie (T)
M.	PESTIS Jean		TP Anatomie, Physiologie humaine (T)

Mme	PIETTE Colette		CES Hématologie 5 A - Biologie (T)
M.	POULLAIN Pierre		CES Hématologie 5 A - Biologie (T)
M.	POUSSET J-Louis		TP Chimie extractive 5 A (T)
M.	QUENEZ Pierre		TP Chimie générale et minérale 1 A (T)
Mme	RABIAN Odile		ED Chimie analytique qualitative (S)
M.	RABARON Alain		CES Pharmacotechnie galénique (délég)
Mme	ROBERT Monique		CES Immunologie - Microbiologie (T)
M.	RODIER Noël		ED Physique 2 A (S)
Mlle	ROLLEN Alice		TP Botanique 1 A (T)
Mlle	ROUSSELET Renée		Essais médicaments végétaux (T)
Mme	RUDLER Michèle		ED Chimie organique 1-2 A (délég)
Mme	SALES Nicole		TP Physiologie, Histologie (T)
Mlle	SEBASTIEN Francine		TP Microbiologie 5 A (Biologie officine) (délég)
M.	SCHUSTER Jean		Essais des médicaments chimiques et galéniques (T)
Mlle	SORIA Claudine		Biologie officine 5 A (S)
Mme	SEILLER Monique		TP Pharmacie galénique industrielle (T)
Mlle	STRUPLER Nicole		ED Chimie générale et minérale 1 A (T)
M.	TOUBOUL J-Pierre		TP Chimie analytique 5 A (délég)
M.	TRIEU Thuong Cong		TP Chimie analytique quantitative (T)
Mlle	TROUPEL Solange		TP Chimie analytique quantitative (S)
Mme	VAN AMERONGEN G.		ED Chimie analytique quantitative (délég)
M.	VAYSSIERE J-Michel		ED Chimie organique 1-2 A (délég)
M.	VILLERS Jacques		TP Physique 2 A (T)

Mme WELBY Josette TP Pharmacie galénique (S)

BIBLIOTHEQUE

Mlle RUYSSSEN Y. +..... Conservateur en Chef
Mme DESGRIPPES A. Conservateur
Mme COULET M. A. Conservateur
Mlle LANGLOIS C. Conservateur
N... .. Conservateur

+ Chevalier
O Officier
C Commandeur

Liste mise à jour au 15 septembre 1970.



A Mademoiselle le Professeur S. LAMBIN,

Professeur de Microbiologie à la
Faculté de Pharmacie de Paris,
Chevalier de la Légion d'Honneur.

Qui nous a aimablement recueillis
dans son laboratoire pour
nous faire suivre des certi-
ficats et faire cette recher-
che, et qui n'a pas cessé de
nous guider et de nous con-
seiller.

En témoignage de nos remerciements
cordiaux et de notre respec-
tueuse gratitude.



A Monsieur le Professeur Ai. Desvignes
qui nous a fait l'honneur
d'accepter d'être membre
du jury.

A Monsieur J. Bory
qui nous a fait l'honneur
de faire partie du jury.



à mon pays

L'IRAN.

A ma famille.

Aux ~~am~~is et personnel

de laboratoire.

ERRATUM

Page 5	ligne 3	pathogène
" 5	" 5	lieu de tenir compte
" 5	" 18	letale
" 8	" 22	voir pages 57 - 60
" 12	" 19	1 sur 10 ¹⁰
" 15	" 4	parfois
" 17	" 26	g/l
" 19	" 8	substance
" 20	" 1	à souligner
" 20	" 25	méthodes des suspensions
" 24	" 8	thioglycolique
" 24	" 8	0,01 %
" 24	" 9	le chlorure de calcium
" 24	" 16	après l'ensemencement
" 31	" 26	8 hydroxyquinoleine
" 34	" 19	bactériostatique
" 36	" 19	sont de l'ordre de = sont exprimés en
" 38	" 8	Desvignes (A) (8)
" 39	" 15	Microbiologie
" 40	" 1	pyogènes
" 40	" 6	La constitution du bouillon nutri- tif (à double concentration) que nous avons utilisée est :

Peptone 20 gr

ClNa 10 gr

extrait de viande 10 gr
 eau distillée 1 000 ml
 p h ajouter à 7,2
 stériliser 20 minutes à 120 °,
 filtrer.

Page 41	ligne 5	Hydrolyse.
" 41	" 10	Cendres
" 46	" 20	Temps de stérilisation = 10 minutes à 120 °.
" 52	" 15	"
" 64	" 4	(fig. n° 1)
" 64	" 11	Une phase
" 64	" 20	<u>c)</u>
" 69		Sur la courbe : sur l'axe des ordonnées : % de lumière transmise. sur l'axe des abscisses : heures.
" 72	" 12	Divisions du galvanomètre. (% de lumière transmise.)
" 86	" 14	Duchènne (J)

TABLE DES MATIERES

<u>Introduction</u>	3
<u>Première partie :</u>	
<u>Généralités sur les substances antibactériennes :</u>	5
- Modalités d'action des substances antibactériennes	7
- Les associations des substances antibactériennes	10
- Rappel des méthodes de détermination de l'activité antibactérienne in vitro :	13
I - Mesure de l'activité bactériostatique	13
A - Les méthodes de dilution	14
1 - Méthode de dilution en milieu de culture liquide.	14
2 - Méthode de dilution en milieu de culture solide.	17
B - Les méthodes de diffusion en milieux solides.	18
C - Les méthodes par contact.	19
II - Détermination de l'activité bactéricide.	20
1 - Les méthodes de suspensions.	20
2 - Les méthodes des portes germes.	21
3 - La méthode de diffusion.	21
4 - Les méthodes manométriques.	21
5 - Les méthodes enzymatiques.	22
6 - Les autres méthodes...	22
- Conditions influençant l'action des substances antibactériennes.	23
- Effet de la composition des milieux de culture	24
<u>Deuxième partie ; Essais personnels.</u>	
I - Détermination de la concentration bactériostatique des substances en essai par la méthode des dilutions en milieu liquide :	29
A - Substances antibactériennes étudiées.	29

B - Détermination de l'activité bactériostatique.	34
- Détermination de la dose bactériostatique vis-à-vis des spores de "B. Subtilis"	35
- Différence obtenue dans la concentration bactériostatique à l'égard de B. Subtilis à partir des formes sporulée et végétative	36
C - Préparation de la suspension microbienne.	37
D - Bactéries mises en essai et milieux utilisés.	38
- Essais portant sur St. aureus.	40
- Essais portant sur Kl. pneumoniæ.	44
- Essais portant sur B. Subtilis.	46
- Essais portant sur Strep. faecalis.	50
- Essais portant sur E. Coli.	52
- Essais portant sur Pseudomonas aeruginosa.	54
- Influence de l'espèce microbienne sur la concentration bactériostatique des substances antiseptiques en milieu semi-synthétique.	57
- Influence de l'espèce microbienne et du milieu utilisé sur la concentration bactériostatique des substances antiseptiques.	61
<u>Conclusion</u>	63
II - Etude quantitative de la croissance bactérienne.	64
- Phases de croissance.	64
- Le biophotomètre enregistreur.	69
- Analyse et interprétation des courbes de croissance bactérienne obtenues au biophotomètre enregistreur.	70
- Possibilités d'étude offertes par le biophotomètre enregistreur.	74
- Aspects des courbes de croissance :	74
A - Courbe normale ou témoin.	74
B - Courbes obtenues en présence d'un agent antimicrobien.	75

- Essais personnels :	77
- I Influence du milieu de culture.	77
- II Influence des antiseptiques sur les cour- bes de croissance de germes en essais.	86
Conclusion	94
Conclusion générale	97
Bibliographie	98

INTRODUCTION

La détermination de l'activité bactériostatique d'une substance chimique est toujours effectuée en milieux complexes tels que le bouillon peptoné salé, or la constitution de ce milieu est loin d'être constante ; elle peut varier selon l'origine de la viande utilisée ; selon la nature de la peptone utilisée, laquelle favorise plus ou moins le développement de certaines espèces bactériennes.

Dans le but de pouvoir établir une technique valable dans tous les laboratoires de microbiologie, il nous a paru intéressant d'étudier la possibilité d'utiliser un milieu synthétique ou semi-synthétique de constitution connue et facilement reproductible par tous.

Un tel milieu aurait l'avantage de ne pas contenir certains constituants organiques susceptibles de neutraliser ou, éventuellement de renforcer l'activité antibactérienne de la substance étudiée.

Il est bien évident que l'on ne peut réaliser un milieu convenant à la croissance de bactéries de toutes les espèces pathogènes connues : ces bactéries sont hétérotrophes et elles diffèrent dans leurs exigences nutritives, notamment dans leurs besoins en facteurs de croissance, tels que vitamines, acides aminés, bases puriques.

Mais l'on peut cependant rechercher un milieu approprié à quelques espèces bactériennes différentes.

Après avoir étudié la valeur proliférative de plusieurs

nous avons finalement adopté les plus faciles à préparer, au sein des milieux de composition simple, donnant une culture abondante.

Nous avons également étudié la valeur d'un milieu semi-synthétique comparativement avec celle du bouillon de viande peptoné salé d'utilisation courante.

PREMIERE PARTIE

GENERALITES SUR LES SUBSTANCES ANTIBACTERIENNES.

Les substances dénommées antiseptiques sont, plus spécialement, celles qui doivent inhiber ou détruire localement les germes pathogènes chez les êtres vivants, sur un tégument, dans une plaie infectée, une cavité naturelle ou pathologique. Il y a donc lieu d'obtenir compte, dans l'antiseptie locale qu'elles exercent par contact, de leur nocivité propre pour les cellules et tissus de l'organisme infecté, et les concentrations utilisables se trouvent, de ce fait, limitées.

On réserve généralement le nom de désinfectants aux substances destinées à détruire les germes pathogènes partout où ils se trouvent en dehors des êtres vivants, dans le milieu extérieur (eaux, air, locaux, objets, linge, excréta, etc...). Aucune limite ne s'oppose aux concentrations utilisables, hormis le risque de détérioration de certaines matières, ou l'utilisation ultérieure du produit désinfecté ; aussi ces substances peuvent-elles exercer au maximum leur action létale (bactéricide). On les utilise, en hygiène, pour réaliser la désinfection.

Aucune propriété fondamentale ne distingue donc antiseptiques et désinfectants, si ce n'est le fait que les premiers sont utilisés en thérapeutique humaine ou animale, les seconds en hygiène. Une même substance chimique peut, selon la concentration à laquelle on l'utilise et selon le temps pendant lequel elle agit, se contenter d'inhiber la multiplication des bactéries, ou aller jusqu'à les détruire définitivement. (effet bactériostatique ou bactéricide)

On doit maintenant adjoindre aux antiseptiques et aux désinfectants, 2 autres groupes de corps susceptibles d'inhiber provisoirement ou définitivement de façon plus ou moins spécifique, le développement des bactéries, dans l'organisme même. Ces corps nouveaux permettent de réaliser une antiseptie générale, car ils sont assez peu toxiques, aux concentrations actives contre les bactéries, pour être introduits dans l'organisme même, par voie digestive ou inoculation. Dans ce dernier cas ils sont véhiculés par voie sanguine, et vont, éventuellement, atteindre les bactéries au sein du foyer infecté et stopper l'évolution d'une infection générale ou locale en cours. Ces substances sont d'une part des dérivés chimiques de synthèse nés avec l'avènement des sulfamides et dits "médicaments chimiothérapeutiques" et d'autre part, les "substances antibiotiques", c'est-à-dire des substances chimiques, d'origine biologique, élaborées par des champignons, bactéries, végétaux ou animaux (par biosynthèse) et capables, à très faibles concentrations, (de l'ordre de μ ou gamma par ml, c'est-à-dire du milligramme par litre, in vitro), de s'opposer à la multiplication de certaines espèces bactériennes.

Actuellement beaucoup de ces substances d'origine biologique sont obtenues par synthèse dans l'industrie pharmaceutique.

MODALITES D'ACTION DES SUBSTANCES ANTIBACTERIENNES.

Il existe deux degrés dans l'activité antibactérienne; l'activité bactériostatique ou inhibitrice ; c'est-à-dire la faculté de s'opposer provisoirement à la multiplication des bactéries en essai , ce qui n'implique pas une mort définitive des germes.

L'activité bactéricide, dite encore germicide, c'est-à-dire la faculté de tuer les bactéries en un temps donné, les privant définitivement du pouvoir de se multiplier si elles venaient à être soustraites à l'action de la substance et à se trouver transportées dans des conditions favorables à leur développement.

Rappelons que les substances antiseptiques sont douées d'activité bactériostatique a faible concentration ; peu nocives pour les cellules de l'organisme, elles peuvent alors être utilisées par contact prolongé ou renouvelé avec un tissu; à concentration plus forte, elles acquièrent le pouvoir bactéricide, et sont alors utilisées à titre de substances désinfectantes, pour détruire rapidement les bactéries dans le milieu extérieur ou sur un corps inerte.

Les substances antibiotiques, produites par des micro-organismes présentant, à l'état de solution diluée, le pouvoir d'inhiber la croissance d'autres micro-organismes et pouvant même les détruire. Le mot antibiose choisi par Vuillemin (1889) explique les relations biologiques dans lesquelles un être vivant en détruit un autre pour assurer sa propre

existence.

Presque tous les antibiotiques présentent une activité bactériostatique, et c'est elle aussi qui est mise à profit chez les divers dérivés synthétiques utilisés en chimiothérapie antibactérienne pour attaquer les bactéries à l'intérieur d'un organisme vivant. La streptomycine, la polymyxine, et la colistine, semblent douées d'un pouvoir bactéricide marqué.

La recherche de l'activité de ces diverses substances sur les bactéries doit tout d'abord être effectuée in vitro. Pour les substances désinfectantes, cette recherche est suffisante, pourvu qu'elle soit effectuée dans des conditions de milieu voisines de celles de leur utilisation. Pour les substances antiseptiques, il y a intérêt à étudier aussi, in vivo, sur l'animal, l'action toxique locale ou le pouvoir de cicatrisation. Pour les deux autres groupes de corps, destinés à agir dans l'organisme même, des études expérimentales, in vivo, doivent nécessairement accompagner les essais in vitro lorsque l'on dispose d'une espèce animale permettant de suivre l'évolution de l'infection que l'on cherche à traiter et son inhibition.

Toutes les espèces microbiennes ne sont pas également sensibles à un antiseptique donné (voir pages n° 55-60). Le choix du microbe dépendra donc du but que l'on désire atteindre. C'est ainsi que des antiseptiques destinés au traitement des plaies seront étudiés en présence des microbes pyogènes (staphylocoques, streptocoques, ...) ; s'ils sont destinés à la désinfection des matières fécales, on aura recours au bacille typhique ou au vibrion cholérique. S'il y a lieu d'évaluer la force de résistance des spores, on utilisera soit celles du B. Subtilis, soit celles de la bactérie du

charbon. Dans chaque cas, il convient, dans l'expression des résultats, de mentionner nettement l'espèce et la forme microbienne employées. Il serait encore mieux de spécifier la souche même employée en raison des différences, parfois considérables, que présentent diverses souches d'une même espèce.

LES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES ET D'ANTISEPTIQUES.

C'est surtout en milieu liquide que l'étude a été faite. La bactériostase peut être jugée par l'analyse des courbes de croissance. On observe un effet d'addition. Pour obtenir la même bactériostase que celle déterminée par chacun des antibiotiques à dose forte, on peut recourir à l'association de doses plus faibles des uns et des autres.

L'étude de la bactéricidie consiste à préciser le nombre de germes survivants après un temps donné de contact du germe avec les antibiotiques ou les antiseptiques isolés ou associés.

Trois éventualités sont possibles :

- ou bien le nombre des survivants est le même avec l'association que celui obtenu avec les antibiotiques isolés : on dira que l'association est indifférente ;

- ou bien le nombre est inférieur, l'association est synergique ;

- ou bien le nombre est supérieur ; il y a antagonisme. C'est évidemment ce dernier cas qui mérite de retenir toute l'attention. Une association d'antibiotiques pourrait-elle donc être nuisible ?

En apparence paradoxal, ce fait s'explique pourtant si l'on veut bien réfléchir que les antibiotiques s'adressent à

des stades différents du métabolisme du germe.

Qu'un des antibiotiques associés arrête l'un de ces métabolismes à un stade antérieur à celui sur lequel l'autre est doué d'une très grande efficacité, on comprend que le premier antibiotique risque de supprimer l'effet du second.

Ainsi Jawetz et Gunnison, après de nombreuses études d'associations d'antibiotiques, avaient proposé de ranger les antibiotiques en deux catégories : la première contiendrait les antibiotiques essentiellement bactéricides, comme la pénicilline et la streptomycine ; la seconde, l'auréomycine, la terramycine et le chloramphénicol, qui seraient surtout bactériostatiques. Et ils émettaient la règle schématique suivante ; on peut, avec de bons résultats associer entre eux les antibiotiques appartenant à l'une ou à l'autre catégorie ; mais il ne faut pas de peur d'obtenir un effet antagoniste, associer un agent bactéricide à un agent bactériostatique.

Cette affirmation a été très discutée ; en effet souvent, si au bout de 48 heures, dans le cas par exemple de l'association in vitro de pénicilline et de chloramphénicol, un effet antagoniste est observé, ultérieurement par contre, on assiste, dans le cas de l'association, à une stérilisation lente et presque complète, à l'inverse de ce qui se passe avec la pénicilline seule. Après un antagonisme à court terme s'installe une synergie très nette.

Quant à la résistance sa chance de survenue est limitée considérablement par les associations ; car ici aussi chaque antibiotique agit pour son propre compte. Si cette chance est, pour un germe à l'égard d'un antibiotique seul de 10^{-7} , elle devient pratiquement nulle si deux ou plusieurs antibiotiques

sont associés.

- Des souches résistantes : une souche résistante est une souche qui n'est inhibée que par des concentrations qui ne peuvent être obtenues in vivo, dans l'organisme du malade traité ;

- des souches sensibles : dont la croissance est inhibée par des concentrations d'antibiotiques ou antiseptiques que l'on peut maintenir dans le sérum des malades avec des traitements habituels ;

- des souches dites limites : dont la concentration minima inhibitrice ne peut être obtenue in vivo que dans certaines localisations, ou bien en employant des voies d'introduction et des taux thérapeutiques très différents des traitements habituels.

Cependant, au sein d'une population bactérienne apparemment sensible, peut apparaître un très petit nombre d'éléments résistants à un antibiotique donné. Il s'agit soit d'une mutation, phénomène spontané, non induit, ayant une fréquence de l'ordre de 1 sur 10^8 ; soit d'une transformation génétique par transfert d'une acide désoxyribonucléique (DNA), d'une bactérie résistante ; cette fréquence s'avère alors beaucoup plus grande.

Et, dans un tube resté un certain temps dépourvu de développement microbien, on peut observer par développement de ces germes résistants un "phénomène de rebond" avec apparition d'une croissance qui deviendra égale de celle du Témoin puisque les mutants résistants qui se trouvent sélectionnés se développent sans voir leur croissance entravée par la présence de l'antibiotique.

Rappel des méthodes de détermination de l'activité antibactérienne in vitro

Il n'existe pas de différence fondamentale entre les méthodes permettant d'évaluer in vitro l'activité des substances antiseptiques, désinfectantes, chimiothérapiques ou antibiotiques.

Les auteurs des méthodes actuellement répandues pour l'étude de ces dernières substances antimicrobiennes se sont en fait inspirés de celles antérieurement établies pour l'essai des antiseptiques qui ont par retour, dans ces dernières années, bénéficié des recherches extensives dans le domaine des antibiotiques. La technique d'essai adoptée varie surtout selon la nature de la substance étudiée et selon les conditions dans lesquelles cette substance sera appelée à agir.

I - Mesure de l'activité bactériostatique

consiste à déterminer la plus faible concentration de la substance qui se montre capable d'inhiber la multiplication des bactéries.

Dans les méthodes destinées à évaluer le pouvoir bactériostatique, les microbes sont maintenus dans le milieu de culture contenant la substance antiseptique ; il n'y a pas de report des germes dans un autre milieu, d'où le nom de "méthodes statiques" proposé par certains auteurs.

On fait appel à trois groupes principaux de méthodes.

A) la substance étudiée peut être incorporée à dilutions croissantes dans le milieu de culture ensemencé.

B) déposée localement à la surface de ce milieu solidifié de façon à diffuser autour de ces points de contact.

C) ou mise en contact avec toute la surface d'une culture sur milieu solidifié.

x x x
 x

A - Les méthodes de dilution.

Elles sont utilisées lorsque la substance à l'étude est soluble dans l'eau ou complètement miscible à l'eau.

1 - Méthode de dilution en milieux de culture liquides

La recherche de la concentration limite inhibant la multiplication est effectuée le plus souvent en milieux de culture liquides. Ces milieux varient selon la nature des bactéries et de la substance en essai.

La substance liquide, ou une solution aqueuse de la substance ^{solide}, est introduite, à dilutions croissantes, dans le milieu de culture ensemencé avec la bactérie en essai et l'on recherche la plus forte dilution (ou la plus faible concentration) de cette substance qui peut encore s'opposer à la multiplication microbienne, dans des conditions optimum rigoureusement définies.

La concentration, limite efficace qui définit la "limite d'activité" de la substance, peut être appréciée par divers procédés :

a) le plus souvent, la lecture des résultats s'effec-

tue par simple constatation de l'absence de culture visible (inhibition de la multiplication microbienne) ; les résultats sont observés après 24 à 48 heures d'incubation à $+37^{\circ}\text{C}$. pour les substances antiseptiques, parfois plus tardivement, et à 20°C . pour les substances désinfectantes destinées à agir dans le milieu extérieur. Pour les substances antibiotiques, dont l'action est souvent plus fugace, elle se fait dès la seizième à dix-huitième heure de culture à $+37^{\circ}\text{C}$.

On note aussi éventuellement le retard apporté à la croissance ou la réapparition d'une culture tardive.

b) lecture photométrique.

(méthodes turbidimétriques, méthode des courbes de croissance)

Ce mode d'appréciation des résultats repose sur le fait que le degré d'inhibition d'une culture en milieu liquide est fonction de la concentration de substance inhibitrice dans le milieu. On peut donc, en utilisant des électrophotomètres ou absorptiomètres divers, établir, pour une souche bactérienne et un milieu de culture définis, une courbe étalon traduisant la densité optique de la culture à différents temps de son évolution, en fonction des concentrations présentes d'une substance inhibitrice étalon. On évalue ainsi la concentration de la substance par simple lecture de la densité optique du milieu de culture.

Pour déterminer la concentration en substance active d'un échantillon inconnu de la même substance inhibitrice, on effectue des cultures parallèles en présence de quantités variables de cette substance, en mesurant leur densité optique. Celles-ci sont reportées sur la courbe étalon obtenue dans les mêmes conditions.

Ces techniques sont rapides et faciles, mais nécessitent l'utilisation d'appareils coûteux. Elles ne sont possibles que lorsqu'on dispose d'un étalon de référence, d'activité

stable.

On tend actuellement, pour les besoins de l'industrie, à leur demander une réponse de plus en plus rapide. Dans ce but, on recherche l'activité bactériostatique à l'égard d'une souche connue pour son rapide départ de croissance et on stoppe le développement des cultures en pleine phase active de multiplication (phase logarithmique) c'est-à-dire vers la troisième ou quatrième heure d'incubation à + 37° C. On mesure à ce temps (t) la densité optique des cultures contenant des concentrations variables de la substance à l'étude. On reporte ces densités optiques sur la courbe étalon, pour connaître les concentrations correspondantes en principe actif.

Cette technique particulièrement étudiée par D. A. Joslyn, Osgood et H. Velu, a été adoptée par la Pharmacopée française de 1949 pour le titrage du sulfate de dihydrostreptomycine (Codex 1949, P. 859). La bactérie dont on étudie l'inhibition est le pneumobacille (*Klebsiella pneumoniae*), cultivé pendant quatre heures, dans des conditions rigoureusement définies, en présence de quantités de sulfate correspondant à des concentrations en streptomycine base s'échelonnant entre 0,3 et 2,1 μ g par ml.

c) par recherche de l'inhibition d'une manifestation particulière, facile à observer, de la vitalité microbienne :

- Absence de fermentation d'un sucre (Sureau) ;
- Absence de coagulation d'un lait (Lamensans et Sanchez) ;
- Absence de réduction d'un indicateur de r_H (réduction du vert janus avec *W. Perfringens* ou cl. *Butyrlicum*. (méthode de A. R. Prévot)
- Inhibition du pouvoir hémolytique ;
- Diminution de la respiration ;
- Disparition de la luminescence, etc...

2 - Méthode de dilution en milieux de culture solides.

Les dilutions de la substance étudiée peuvent être réalisées en milieux de culture solidifiés par addition de gélose ou de gélatine. Ces milieux ayant été liquéfiés au bain-marie au moment de l'essai, puis additionnés de quantités croissantes de la substance étudiée, sont ensuite coulés en boîte de Petri.

L'antiseptique se trouve alors dissous ou réparti en suspension homogène dans le milieu solide que l'onensemence ultérieurement avec une quantité connue de suspension bactérienne uniformément répartie en surface. Le nombre de colonies développées en présence de diverses concentrations de la substance antiseptique permet ~~de~~ déterminer l'activité relative de celle-ci.

On peut encore ensemenecer en stries, par simple attouchement de la gélose avec un fil chargé de culture. L'ensemencement de diverses espèces bactériennes permet d'étudier simultanément l'activité à leur égard de la dilution antiseptique ou antibiotique à l'étude.

Expression des résultats :

Quelle que soit la technique adoptée et la propriété dont on a recherché l'inhibition, les résultats peuvent être exprimé en valeur absolue ou en valeur relative.

a) En valeur absolue : si l'on a affaire à un corps chimique pur, on exprime la concentration active en grammes par litre (g), ou en milligrammes (mg), en microgrammes ($1 \mu g = \frac{1}{1000}$ de mg) ou en milligamma ($\frac{1}{1000}$ de μg) par ml.

b) En valeur relative : le plus souvent, l'activité de la substance est comparée à celle d'un produit de nature identique ou ainsi voisine, que possible et exprimée, par le rapport entre la dilution inhibitrice de la substance étalon et la dilution inhibitrice de la substance à l'étude.

S'il s'agit d'une préparation complexe dont le principe actif n'a pas été isolé, comme c'est le cas de nombreux antibiotiques, on utilise une unité conventionnelle ment définie ; ainsi l'unité internationale de pénicilline (correspondant à l'activité de 0,6 μ g de l'étalon international de benzylpénicillinate de Na ou Pénicilline G pure).

B - Les méthodes de diffusion en milieux solides.

La méthode de "diffusion" en milieu solidifié, est utilisée pour l'étude des substances antiseptiques, insolubles dans l'eau ou incomplètement miscibles à l'eau, ou pour l'étude de préparations complexes. Elles rendent de grands services pour l'étude des substances antibiotiques, notamment lorsque ces substances n'ont pu être isolées à l'état pur des liquides biologiques qui les contiennent. Elles ne sauraient toutefois prétendre à la précision des méthodes des dilutions ; ce sont des méthodes d'orientation ou de titrages approximatifs, suffisantes également pour les besoins de la clinique.

Le principe en est le suivant : les poudres antiseptiques, les substances antibiotiques, les dilutions, solutions, extraits végétaux ou filtrats de culture de champignons à l'étude, sont mises en contact, localement en plusieurs points, avec la surface d'un milieu de culture gélosé préalablement ensemencé avec la bactérie sensible choisie et coulé en boîtes de Pétri. On utilise pour ceci des supports divers, destinés à recevoir la substance étudiée,

à dilutions variables. Après vingt-quatre heures d'incubation à +37° C, on apprécie la sensibilité du germe d'après la longueur de la zone d'inhibition partant de la gouttière.

C - Les méthodes par contact.

Elles s'appliquent aux préparations complexes insolubles (pommades antiseptiques par exemple) et aux produits gazeux ou vaporisables (fumigations, aérosols, désinfectants atmosphériques). Les substances à étudier sont étalées, vaporisées, évaporées à la surface de milieux solides coulés en boîtes de Pétri qui seront ultérieurement ensemencées.

Cette technique a été préconisée (Coletsos, 1951) pour l'étude des substances antituberculeuses insolubles dans l'eau. Le milieu solide favorable à la culture de ce germe (milieu solide de Lowenstein par exemple) est imprégné en surface, douze heures avant l'ensemencement par des dilutions variables de la substance, assurant une concentration calculée par centimètre carré de surface ; on détermine, après incubation, la concentration minimum efficace.

II - Détermination de l'activité bactéricide ;

... ; consiste à déterminer la plus petite dose capable de tuer les germes, de sorte qu'ils ne puissent plus proliférer dans un milieu de subculture où sont réalisées les conditions optima de culture.

Dans cette mesure il y a deux phases à distinguer :

- la première comporte l'action de la substance chimique sur les germes, pendant un temps de contact déterminé, dans un milieu intermédiaire bien défini;
- la seconde consiste à observer le résultat de cette action par transport d'une quantité donnée du mélange dans un milieu de subculture favorable.

Dans la première phase, trois facteurs, nettement distincts, sont à considérer :

- 1) les germes ;
- 2) la substance antibactérienne;
- 3) le milieu intermédiaire où s'effectue leur contact;

Pour effectuer un essai de ce genre, il faut préciser ces trois termes d'une façon rigoureuse.

Des techniques différentes peuvent être utilisées pour la détermination de la dose bactéricide. Parmi celles-ci, les plus couramment utilisées pour l'essai des substances solubles dans l'eau sont :

- 1) Les méthodes dites méthodes de suspensions, ou des dilutions en séries, dans lesquelles une suspension des germes à l'étude est mise en contact avec la substance antibactérienne à concentration variable, puis, après un temps donné, une fraction du mélange est transportée dans un milieu de subculture.

Cette méthode simple se heurte à des difficultés pratiques du fait qu'une certaine quantité de substance anti-

microbienne, transportée dans la subculture, peut ultérieurement gêner, par une action bactériostatique, le développement des germes. Ceci est surtout marqué pour les substances fortement bactériostatique, telles que les détergents, les organo-mercuriels, etc...

2) Dans un autre groupe de méthodes, on s'efforce, autant que possible, d'éliminer l'action de l'antiseptique, soit par dilution du prélèvement, soit par lavages répétés des germes traités, ou par des neutralisations chimiques. Pour atteindre ce but, il y a surtout une méthode permettant d'éliminer, par lavage des germes, par centrifugation, l'action de la substance transportée. Cette méthode appartient aux méthodes des suspensions. Après action des substances antibactériennes sur les bactéries, on centrifuge chaque mélange; les culots sont lavés, par centrifugation, à plusieurs reprises, à l'eau distillée stérile ou un autre solvant, puis ils sont mis en subculture.

3) Quant aux méthodes des porte-germes, depuis longtemps utilisées, elles consistent à déposer les germes sur un support inerte (fil de soie, bille de verre, papier...) avant de les immerger dans la solution antibactérienne. Après un temps de contact suffisant, lavages ultérieurs ou neutralisation en vue de débarrasser les germes de substances antibactérienne, ceux-ci sont transportés dans un milieu de subculture favorable.

4) Autres méthodes de détermination de l'activité bactéricide in vitro :

A) la méthode de diffusion : cette méthode est largement appliquée à l'étude du pouvoir bactériostatique des substances antibiotiques.

B) méthodes manométriques : elles reposent sur la

perte ou la diminution d'une des fonctions essentielles, témoins de vitalité des bactéries traitées.

C) méthodes enzymatiques : ces méthodes sont basées sur l'inhibition de certaines réactions métaboliques bactériennes par les substances antimicrobiennes.

D) méthodes basées sur l'arrêt de mobilité des micro-organismes.

E) méthodes basées sur l'agglutination quantitative des organismes d'essai par les germicides tels que les ammoniums quaternaires.

F) technique basée sur la fixation de la substance bactéricide sur la laine.

G) méthodes-electrophorétiques.

H) méthodes néphélimétriques.

CONDITIONS INFLUENCANT L'ACTION DES SUBSTANCES ANTIBACTERIENNES.

A côté des conditions générales de température et de temps qui interviennent dans l'action antiseptique comme dans toute réaction chimique ou physico-chimique, il y a des conditions particulières qui dépendent de chacun des trois facteurs en présence : antiseptique, microbe, milieu intermédiaire.

A - Conditions générales :

Température et durée de contact avec les germes.

B - Conditions dépendant des microbes :

Nombre des microbes - Espèce microbienne - souche bactérienne - Age des germes - résistance individuelle - résistance acquise, accoutumance.

C - Conditions dépendant de la substance désinfectante

1 - Conditions physiques : solubilité dans l'eau - solubilité dans les lipides - tensio-activité - adsorbabilité gonflement et floculation protoplasmique. Lyse et coagulation.

2 - Conditions chimiques : stabilité - Ionisation - hydrolyse .

Nous n'insisterons pas sur tous ces facteurs qui ont été déjà étudiés.

D - Conditions dépendant du milieu

EFFET DE LA COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE.

MILIEUX DE CULTURE.

L'importance de la composition de milieux, au cours des essais des substances antimicrobiennes, a été remarquée, par plusieurs auteurs.

O'Meara (R. A. Q.) et M.C. Sween (J. C.) (1936) (34) ont constaté que le simple vieillissement d'un bouillon peut empêcher le développement de faibles quantités de Staphylocoques. Cependant celui-ci récupère son pouvoir nutritif après addition d'acide Thioglycolique(0;0%) ou par ébullition ou par précipitation par le phosphate de sodium et chlorure de calcium.

D'après les auteurs cités, le pouvoir inhibiteur du milieu conservé serait dû à une combinaison entre les traces de cuivre contenues dans la peptone du commerce et les constituants du milieu. En effet, un bouillon frais, additionné de traces de cuivre (au même taux que la peptone du commerce), ne donne pas de culture après un ensemencement d'un petit nombre de Staphylocoques. Le même bouillon stérilisé perd son pouvoir d'inhibition.

D'autres auteurs ont souligné l'influence notable de la composition du milieu sur la résistance des bactéries aux agents chimiques , ainsi que Brewer (C. M.) (1943) (35) dans une étude consacrée aux variations du coefficient Phénol de certains désinfectants, avait observé que ces variations pro-

viendraient de la nature de peptone utilisée pour la préparation des milieux de culture, et spécifiait qu'une standardisation de la préparation de ces milieux contribuerait à une amélioration de la méthode et à l'exactitude des résultats obtenus.

Dé même Loo (H. Y.) et Coll (1945) (36) au cours de l'essai de la streptomycine par la méthode des disques de papier sur plaque de gélose, insistèrent sur l'influence des lots d'extraits de viande et de peptones employés. La même année, Wolf (Paul A.) (1945), après avoir employé dans un milieu, comme principale source d'azote, un amino-acide de la caséine hydrolysée et l'uracile, avait remarqué que les cultures d'E. typhosa et de S. aureus, cultivées, dans ce milieu, maintiennent une résistance au phénol égale ou plus grande que celle obtenue avec le milieu F. D. A. (cf. Thèse SAID (29) à la peptone. En plus, différents lots de caséine hydrolysée avaient été également satisfaisants.

La nécessité d'un bouillon de culture de composition constante, pour le titrage de la pénicilline par la méthode des dilutions, a été rappelée par Benoist (D.) (1948-1950) (38) et Pelezar (M. J.) (39) en 1952, a insisté sur le besoin de définir exactement l'origine des peptones utilisées. Etudiant le pouvoir bactériostatique et bactéricide de trois composés d'ammonium quaternaire, on a trouvé que l'action de ces produits était beaucoup plus forte en bouillon que sur gélose. (Bradosol, Cétavlon et Stéramine), Paoletti (A.) et Triggiani (L.) (1954).

Etudiant la méthode proposée pour déterminer l'activité antiseptique des substances chimiques, on a noté que le temps de destruction totale d'une population bactérienne varie selon les quantités du milieu de culture utilisé pour déceler

la survie des germes (pH, concentration en peptone, durée de stérilisation). Cook (A. M.) et Wills (B. A.) (1956) (41) Berry (H.) et Beau (1954).

C'est pourquoi nous avons cherché des milieux entièrement synthétiques pour supprimer les effets étrangers agissant sur l'activité bactériostatique des substances antibactériennes et nous avons comparé dans cette recherche l'effet de différents milieux sur ce pouvoir.

Ici il y a lieu d'ajouter l'effet du solvant sur ces activités. La nature du solvant peut intervenir pour accroître ou diminuer l'ionisation de la substance envisagée ou son accumulation aux interfaces, etc ... (cf. thèse Duchenne) (7) ; c'est pourquoi lorsqu'on veut déterminer l'activité bactériostatique et l'activité bactéricide d'une substance, il ne faut pas considérer comme négligeable l'activité du solvant utilisé. Il est nécessaire de choisir un solvant ayant par lui-même une faible activité bactériostatique ou bactéricide, mais il faut également tenir compte de l'influence que peut avoir l'addition de ce solvant sur l'activité de la substance à l'étude. Certains solvants ayant une faible activité bactériostatique et bactéricide, comme les glycols, ont montré une influence très marquée sur la détermination de la concentration bactériostatique et surtout bactéricide de certains antiseptiques. En présence de certains solvants, il est nécessaire d'augmenter la concentration de l'antiseptique jusqu'à 40 fois la concentration active en milieu aqueux. La plupart des solvants ont manifesté une influence différente selon les antiseptiques auxquels on les ajoute, et il est difficile de prévoir la répercussion que pourra avoir l'addition d'un

solvant sur une substance inconnue. Le solvant ne fait que favoriser une action qui appartient en propre à la substance dissoute; celle-ci, comme celles qu'on lui associe, peut intervenir, soit par ses propriétés antiseptiques intrinsèques, soit par diverses modifications adjuvantes apportées à la composition du milieu, tant au point de vue physique que chimique (densité et réaction du milieu). Nous parlerons tout d'abord de l'influence des matières protéiques qui se trouvent toujours présentes lorsqu'on veut exercer une action antiseptique au niveau des tissus, puis successivement celle de diverses substances organiques et minérales et enfin les conditions de réaction du milieu.

1°) Influence des matières protéiques : d'une façon générale, toutes les solutions ou suspensions colloïdales diminuent l'activité des antiseptiques qu'on y introduit; mais ce sont surtout les matières protéiques qui atténuent le plus cette activité. Ce fait, qui a une si grande importance pour l'usage thérapeutique et pour la désinfection, notamment pour le traitement des plaies, est connu depuis les premiers essais de Koch en 1884 et de Behring, en 1890. Les différences dues au milieu varient avec les divers désinfectants et aussi avec les microbes.

Les matières protéiques désintégrées, comme celles qui sont contenues dans le bouillon nutritif ordinaire, en particulier les peptones, exercent, elles aussi, un effet inhibiteur sur l'action de la plupart des antiseptiques. Cet effet inhibiteur se retrouve, pour les dérivés soufrés organiques (sulfamides et sulfones).

2°) Substances organiques diverses : la présence de nombreuses substances organiques dans les liquides ou les tissus des organismes vivants peut diminuer l'activité des antiseptiques en fixant ceux-ci par adsorption (charbon, poussières, matières fécales) ou en les modifiant chimique-

ment de diverses manières. La présence de matières organiques atténue l'action désinfectante du chlore sur les eaux polluées, et l'action stérilisante de la chaleur humide.

Enfin, rappelons que certaines substances organiques (alcool, glycérine), dissoute dans l'eau, modifient l'état d'ionisation ou de tensio-activité du milieu; l'action antiseptique peut donc s'en trouver modifiée. C'est ainsi que vis-à-vis des spores, l'alcool fort diminue très notablement l'activité antiseptique du Phénol (Krönig et Paul).

Par contre, la présence de l'alcool est favorable à l'action du sublimé, mais uniquement aux concentrations comprises entre 15 et 25% : au dessus ou au dessous de ces concentrations, l'alcool exerce une influence défavorable.

3°) Substances minérales : les électrolytes tels que NaCl , $\text{So}_4 \text{Na}_2$, etc..., peuvent, par un recul d'ionisation, diminuer l'activité antiseptique des sels de métaux lourds, de même anion.

On dit également que certains sels, comme ClNa , sans doute par diminution de la solubilité dans l'eau de certains antiseptiques liposolubles tels que le Phénol, renforcent leur activité.

L'addition d'électrolytes peut encore (Lange), accroître l'activité antiseptique, par simple augmentation de la densité du liquide. Il y aurait alors maintien des germes dans un état de suspension plus favorable à l'atteinte du toxique.

Pourtant, il ne faut pas oublier que ClNa , lui-même, à des taux relativement faibles, nuit à la vitalité de la cellule microbienne (Miquel, 1902; Duthoit, 1923); Ce dernier a montré que la grande majorité des germes est détruite entre la première demi-heure et la quatrième heure, par contact avec le soluté de NaCl à 8 p. 1000.

DEUXIEME PARTIE

ESSAIS PERSONNELS



I - Détermination de la concentration bactériostatique des substances en essai par la méthode des dilutions en milieu liquide :

A - Substances antibactériennes étudiées.

Nous avons choisi un certain nombre de substances antibactériennes, appartenant à différents groupes chimiques, et nous avons recherché leur action bactériostatique.

Les substances ainsi étudiées sont les suivantes :

A) Antiseptiques instables.

I - Antiseptiques oxydants :

- Antiseptiques et désinfectants halogénés :

Iode et composés iodés :

Iode ; P. M. = 127.

C'est un désinfectant puissant, actif expérimentalement sur le bacille tétanique et d'autres anaérobies des plaies ; actif également dans les mycoses.

Soluble en présence d'iodures alcalins (solutés iodo-iodurés).

II - Antiseptiques réducteurs :

- Aldéhydes :

aldéhyde formique $\text{HC} \begin{array}{l} \nearrow \text{H} \\ \searrow \text{O} \end{array}$ P.M. = 30

Son action bactéricide est peu marquée. Son pouvoir bactériostatique particulièrement fort, en particulier sur le staphylocoque, les spores de B. Anthracis et le B. pyocyanique.

L'addition de savon augmenterait son activité.

(Uhlenhuth et Hailer, 1922).

B) Antiseptiques stables :

I - Acides

acide borique ; BO_2H_3 P. M. = 61,84
3 3

La solubilité dans l'eau augmente en ajoutant HCl, de l'acide citrique ou de l'acide tartrique.

On l'utilise couramment comme bactéricide et fongicide.

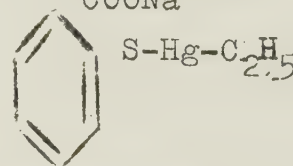
II - Métaux lourds.

Sels et préparations colloïdales organiques :

- Sulfate de cuivre : SO_4Cu P.M. = 160.
4

utilisé comme désinfectant externe (matières fécales) et comme antiseptique sous forme de collyres ou pommades.

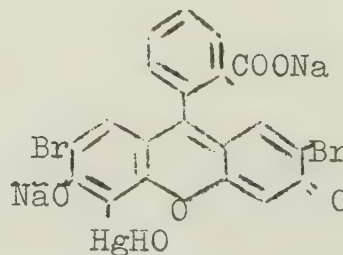
- Merthiolate de Na; thiomersal ; Na-ethylmercuri-thiosalicylate. P.M. = 404,83



très soluble dans l'eau, très fortement bactéricide.

- Mercurochrome ; $\text{C}_{20}\text{H}_8\text{Br}_2\text{HgNa}_2\text{O}_6, 3\text{H}_2\text{O}$

P.M. = 804,75



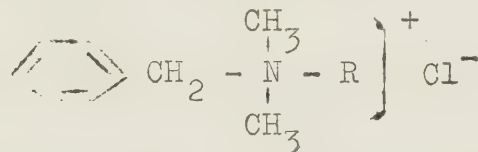
Précaution : des ingestions répétées peuvent être l'origine des empoisonnements chroniques de type mercuriel, et est

provoqué suivant son usage dans le cas des grandes brûlures superficielles.

III - Substances organiques :

1) Composés organiques halogénés :

chlorure de benzalkonium:

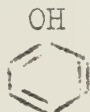


utilisé en teinture à 1 p. 1000 et en pommade ophtalmique à 1 p. 2000.

Les solutions concentrées peuvent se montrer très toxiques et même donner des accidents mortels.

2) Phénols

- Phénol



P.M. = 94,11

Le pouvoir antiseptique des phénols augmente, jusqu'à une certaine limite, avec leur poids moléculaire ; la fixation de groupes alkyl sur le noyau benzenique renforce le pouvoir désinfectant. Dans la série des phénols-alkyles en para, c'est le para-amylophénol ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$) qui montre l'activité maximum.

L'addition de faibles quantités de savons renforce aussi leur action, mais une trop forte proportion l'inhibe.

En présence de soude, à l'état de phénate sodique, l'action bactéricide est nettement atténuée.

- Parachlorophénol

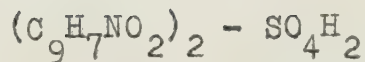
P.M. = 128,56

obtenu par chloration du phénol



3) Dérivés aminés

Quinosol; sulfate de 8 hydroxyquinoline



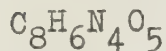
P.M. = 388,41

On utilise des solutions à 1: 2000 pour gargarisme

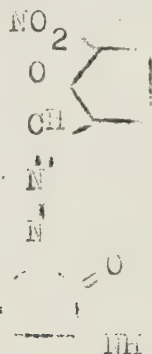
1: 1000 comme douche vaginale.

0,1 % pour lavage de bouche.

- Furadonine ; Furadantin ; Nitrofurantoin



P.M. = 238,16



presque insoluble dans l'eau ; soluble dans le propylèneglycol à l'aide de chaleur (1 p. 400)

Préparation de la solution désinfectante.

Les substances antiseptiques solubles ou liquides sont mises en solution dans l'eau distillée stérile à pH 5,9 - 6,0.

Les solutions servant à préparer la gamme des dilutions sont préparées à partir du produit pur, ou d'une solution-mère conservée au froid, mais sortie du réfrigérateur 2 à 3 heures avant l'essai, afin qu'elle soit à la température du laboratoire au moment de l'emploi.

B - Détermination de l'activité bactériostatique.

Nous introduisons dans une série de tubes stériles, 5 ml de notre milieu de culture à double concentration. Nous ajoutons des quantités croissantes de l'antiseptique étudié mis en solution dans l'eau distillée stérile ; le volume total sera complété dans chaque tube à 9 ml ; nous introduisons ensuite dans chaque tube 1 ml de notre suspension de germes ; préparée en eau distillée stérile contenant 10 millions de germes par ml ; ramenant ainsi la concentration en germe à..

1 million par ml. Des gammes de concentration en antiseptique de plus en plus serrées étaient réalisées en vue d'obtenir les résultats les plus précis.

Les résultats ont été appréciés chaque jour durant 8 jours d'incubation à 37°. Notons que les résultats restent stables seulement après 72 heures. On ne tient pas compte des changements survenus après 72 heures, car il faut rappeler que dans les milieux liquides même un seul germe résistant peut envahir le milieu.

La concentration considérée comme bactériostatique représente la moyenne entre la plus forte concentration ne provoquant pas l'inhibition de la culture et la plus faible concentration exerçant une inhibition totale du développement bactérien.

Détermination de la dose bactériostatique vis à vis des spores de "Bacillus Subtilis".

L'utilisation d'une forme sporulée entraîne également quelques modifications de technique.

Les souches de *Bacillus subtilis* sont conservées en bouillon et réensemencées tous les mois sur ce milieu. Les formes sporulées entrant seules en ligne de compte pour l'essai, il importe d'assurer la sporulation en préparant au moins 5 jours à l'avance les cultures destinées à l'essai. Il faut également disposer d'une grande quantité de germes, et pour cela, il convient de préparer plusieurs tubes de gélose.

Tableau n° 1

Différence obtenue dans la dose bactériostatique à l'égard de B. Subtilis à partir d'une culture de 24 H (forme végétative) et culture de 6-7 jours (forme sporulée). Cette étude est effectuée en milieu semi-synthétique.

Nombre de germes 1 million par ml.

	forme sporulée	forme végétative
P.chlorophénol	350	325
merthiolate	1,75	1,7375
quinosol	57,5	30,82
phénol	1183	1162,5
aldéhyde formique	77,5	43
sulfate de cuivre	3080	1897
acide borique	9135	9130
mercurochrome	60,1	58,32
ch.de benzalko- nium	1,5	0,9625
Iode	152,4	145
Furadoïne	5,62	3,61

Les valeurs données sont de l'ordre du milligramme par litre.

C - Préparation de la suspension microbienne

La suspension microbienne est préparée à partir des cultures, effectuées à 37°, sur gélose, âgées de 24 heures pour les formes végétatives, et de 5 jours pour les formes sporulées. Elle est effectuée, en principe, dans de l'eau distillée de pH voisin de 6,0, dans la majorité des cas. Le liquide de suspension est préalablement stérilisé dans une fiole d'Erlenmeyer en verre pyrex, d'une contenance de 250 cc, dans laquelle se trouvent également des billes de verre lisse, en quantité suffisante pour recouvrir le fond de la fiole.

La suspension est effectuée en introduisant dans le tube de culture, une quantité suffisante d'eau distillée stérile et en laissant les germes diffuser dans le liquide pendant environ 1/4 heure ; quelques légères agitations favorisent la mise en suspension des bactéries. Dans le cas de certains germes ; comme *B. Subtilis*, qui ne se séparent pas de la gélose facilement par simple agitation, nous effectuons la suspension à l'aide d'un anse de platine stérile, mais nous laissons le tube vertical pendant 5 minutes pour que les grosses masses se baissent ; dans tous les cas il faut éviter l'entraînement de masses microbiennes agglomérées ou de particules de gélose, ce qui nécessiterait une filtration ultérieure de la suspension.

A partir de cette suspension mère, nous préparons une dilution, dans une fiole d'Erlenmeyer contenant l'eau distillée et les billes de verres stériles. Après avoir agité suffisamment l'Erlenmeyer, on aura une homogénéisation parfaite du mélange.

Nous opérons cette mise en suspension des germes au dernier moment quand nous avons ajouté aux tubes des quantités

nécessaires d'antiseptique et d'eau distillée.

Le dénombrement des germes mis en suspension est effectué par la méthode opacimétrique, à l'électrophotomètre de Meunier, qui permet, d'après le nombre de graduations du Tambour et l'utilisation des courbes de référence établies pour chaque espèce bactérienne, de calculer directement le nombre de germes par ml de la suspension. Des courbes ont été établies pour plusieurs germes, par M. Desvignes (A.) (1952)()

Les titres de nos suspensions étaient les suivants :

- Staphylococcus aureus : 200 millions par ml. correspond à 33 divisions du Tambour ;
- E. Coli : 200 millions par ml correspond à 36 divisions du Tambour ;
- Pneumobacille : 200 millions par ml correspond à 44 divisions du Tambour ;
- Pseudomonas aeruginosa : 300 millions par ml : correspond à 27 divisions du Tambour ;
- B. Subtilis : 100 millions par ml correspond à 100 divisions du Tambour.

En utilisant ces courbes de référence, nous avons préparé une suspension de germes à 10 millions par ml, en eau distillée stérile. C'est cette suspension que nous avons utilisée au cours de nos essais.

D - Bactéries mises en essai et milieux utilisés

Notre choix a été guidé par la recherche d'organismes appartenant à des groupes différents : bactéries sporulées et non sporulées, gram-positives et gram-négatives.

1) Cocci gram-positifs

Staphylocoque doré Souche Oxford

2) Bacille gram-positif aérobie

sporulé :

Bacillus subtilis, souche 46 x

3) Bacilles gram-négatifs :

Escherichia Coli, souche Lausanne 416

Klebsiella pneumoniae souche Lausanne 444

Pseudomonas aeruginosa, souche Lausanne 414

Les germes étudiés appartiennent à des souches de collection du laboratoire de microbiologie de faculté de pharmacie.

Ces différents micro-organismes sont entretenus sur bouillon de viande peptoné salé . Ils sont réensemencés tous les mois sur ce milieu et conservés au réfrigérateur à 4°.

Essais portant sur *Staphylococcus Pyogènes aureus*
Souche Oxford.

Milieux d'étude

Les essais ont été pratiqués sur les trois milieux suivants :

- 1) Bouillon nutritif à l'extrait de viande.
- 2) Milieu semi-synthétique: formule ci-après
- 3) Milieu de Monod

Donc voici la formule :

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K} + \text{PO}_4\text{HNa}_2$	2 H_2O	5g
NH_4Cl		1g
SO_4Mg		1g
CaCl_2		0,1g
SO_4Fe		0,005g
glucose		2g
eau distillée Q. S. P.		1000 cc
pH = 7 stérilisation 20' à 110°		

(Monod a utilisé le glucose stérilisé par filtration mais il est plus facile de stériliser toutes les substances à la fois, ainsi il a utilisé SO_4Mg 0,1g, Cl_2Ca 0,01g et SO_4Fe 0,0005g par litre, ce qui s'est montré insuffisant pour la culture de nos germes.)

C'est un milieu préconisé pour le Colibacille, mais nous avons trouvé qu'avec cette formule très simple et facile à préparer on peut avoir une culture très satisfaisante avec toutes les bactéries que nous avons mises en essai ;

mais dans le cas du Staphylocoque exigeant en nombreux amino-acides, au lieu d'utiliser un grand nombre d'amino-acides ; nécessitant des pesées longues et fastidieuses, pour des recherches en séries, nous avons utilisé tout simplement l'hydrolyse de la caséine ; commercialisée sous le nom de casaminoacide vitamine free "par la firme Difco" avec la formule précise suivante :

N total 8 pour 100

NaCl 37 pour 100

Cendrier 39 pour 100

La formule suivante répond à notre milieu semi-synthétique :

Bacto vitamine free	référence Difco
Casamino acides	12g
Bacto Dextrose	40g
Sodium Citrate	20g
L. Cystine	0,2g
D. L. Tryptophane	0,2g
Adénine sulfate	20 mg
Guanine Hydrochloride	20 mg
Uracil	20 mg
Thiamine Hydrochloride	2 mg
Pyridoxine Hydrochloride	4 mg
Riboflavine	2 mg
Niacin	2 mg
P. Aminobenzoïc Acide	200 µg
Biotine	0,8 µg
Calcium Pantothénate	400 µg

Dipotassium Phosphate	1 g
Monopotassium Phosphate	1 g
Magnésium Sulfate	0,4 g
Sodium Chloride	20 mg
Ferrous Sulfate	20 mg
Manganèse Sulfate	20 mg

Dissoudre dans eau distillée dans la proportion de 7,5g pour 100 cc d'eau distillée. Chauffer jusqu'à ébullition pour être bien dissout . Ajouter 0,1 γ d'acide folique pour cent, stériliser 10 minutes à 120°.

x

x

x

Tableau n° 2

Concentrations bactériostatiques à l'égard de staphylococcus aureus.

Nombre de germes 1 million par ml. Culture de 24 H

	En bouillon nutritif			En milieu semi-synthétique			En milieu de MONOD		
	24 H	48 H	72 H	24 H	48 H	72 H	24 H	48 H	72 H
Phénol	1350	1620	1833,2 =====	389	632	1023 =====	200	750	1400 =====
Cl. de benzalkonium	0,625	0,875	1,04 =====	0,1	0,162	0,328 =====	0,21	0,35	0,633 =====
Iode	40	108	171,2 =====	23	41	65,6 =====	34	87,5	254 =====
Mercurochrome	45	51	55 ==	42	51	55 ==	0,5	0,675	2,385 =====
Furadoïne	15,25	15,75	16,06	0,91	1,23	1,38	0,9	1,875	5,17

Les valeurs données sont de l'ordre du milligramme par litre.

Essais portant sur *Klebsiella pneumoniae*.

Milieux utilisés

Nos essais ont été pratiqués dans les trois milieux suivants :

- 1) bouillon nutritif à l'extrait de viande
- 2) Milieu semi-synthétique
- 3) Milieu de Monod

Tableau n° 3

Concentrations bactériostatiques à l'égard de *Klebsiella pneumoniae*.

Nombre de germes 1 million par ml. Culture de 24 H

	En bouillon nutritif			En milieu semi-synthétique			En milieu de MONOD		
	24 H	48 H	72 H	24 H	48 H	72 H	24 H	48 H	72 H
Phénol	750	1100	<u>1300</u> =====	1241	1982	<u>2395</u> =====	120	308	<u>503</u> =====
Ch. de Benzalkonium	3,5	5,2	<u>7,8</u> =====	1,92	3,4	<u>4,75</u> =====	0,8	2,2	<u>4,1</u> =====
Iode	225	232	<u>319</u> =====	49,3	138	<u>150,3</u> =====	4,5	13,3	<u>13,42</u> =====
Mercurochrome	6	16	<u>30</u> =====	23,6	66	<u>70</u> =====	0,9	1,1	<u>1,2</u> =====
Furadofine	7,5	13,75	<u>16,33</u> =====	1,22	2,04	<u>2,916</u> =====	1,1	1,75	<u>2,51</u> =====

Les valeurs données sont de l'ordre du milligramme par litre.

Essais portant sur Bacillus subtilis

Cinq milieux ont servi pour ces essais :

- 1) Bouillon nutritif à l'extrait de viande
- 2) Notre milieu semi-synthétique
- 3) Milieu de Monod
- 4) Milieu de Kossel
- 5) Milieu de Martin.

Milieu de Kossel : c'est une formule donnée pour la culture de Pneumobacille, mais à partir de ce milieu, nous avons trouvé une culture très favorable pour le B. Pyocyanique et B. Subtilis. Notre souche de Pneumobacille ne pousse pas sur ce milieu.

Voici la formule donc :

NaCl	5 g
SO ₄ ^{Mg}	0,20 g
PO ₄ H ₂ (NH ₄)	1 g
PO ₄ ^{HK} ₂	1 g
Citrate de Na	2,75 g
eau distillée Q. S. P.. 1000 cc	
Ajuster à pH 7,8. Stériliser à l'autoclave.	

Milieu de Martin :

Saccharose	100 g
Nitrate de Na	2 g
$\text{PO}_4^{\text{HK}}_2$	2 g
SO_4^{Mg}	0,5 g
KCl	0,5 g

eau distillée Q. S. P. 1000 cc

pH ajusté lui-même.

Stériliser 20 minutes à 110°.

Tableau n° 4

Concentrations bactériostatiques à l'égard de B. Subtilis
(spore.)

Nombre de germes 1 million par ml. Culture de 84

	En bouillon nutritif			En milieu semi-synthétique			En milieu de Martin.		
	24 H	48 H	72 H	24 H	48 H	72 H	24 H	48 H	72 H
Phénol	1125	1250	2187,5 =====	864,3	1036,4	1250 ===	1250	2250	2410 =====
Ch. de Ben- zalkonium	0,425	1	1,625 =====	0,9	1,32	1,5 ===	0,251	0,375	0,625 =====
Iode	300	482	500,2 =====	60	142,1	152,4 =====	35	52,5	140 =====
Mercuro- chrome	24,1	28,3	34,33 =====	9,62	42,3	60,1 =====	1,5	1,7	3,08 =====
Furadoïne	7,5	13,2	15 ==	2,5	4,9	5,62 =====	3,2	7,52	14 ==

Les valeurs données sont de l'ordre du milligramme par litre.

Tableau n° 5

Concentrations bactériostatiques de différents antiseptiques à l'égard de *B. subtilis* (spore).

Nombre de germes 1 million par ml. Culture de

	En milieu de KOSSEL			En milieu de MONOD		
	24 H	48 H	72 H	24 H	48 H	72 H
Phénol	300	1052	1110 ====	135	180	2356 ====
Ch. de Benzalko- nium	0,225	0,32	0,45 ====	0,34	0,8	1,248 =====
Iod	10,2	15	25 ==	28,7	45,2	90 ==
Mercurochrome	0,1	0,3	0,483 =====	0,3	0,75	1,30 =====
Furadofine	3,75	6,25	15 ==	2,5	3,5	7,5 ==

Les valeurs données sont de l'ordre du milligramme par litre.

Essais portant sur streptococcus faecalis.

Milieux utilisés :

- 1) bouillon nutritif à l'extrait de viande.
- 2) milieu semi-synthétique.

Après plusieurs essais en milieux synthétiques à partir de ce germe, nous n'avons pas trouvé un milieu parfaitement synthétique qui réponde à une culture satisfaisante de cette bactérie.

Tableau n° 6

Concentrations bactériostatiques de différents antiseptiques à l'égard de streptococcus faecalis.

Nombre de germes 1 million par ml. Culture de 24 H

	En bouillon nutritif			En milieu semi-synthétique		
	24 H	48 H	72 H	24 H	48 H	72 H
Phénol	2500	2750	3030 ====	1642	1986	2300 ====
Cl. de Benzalkonium	2,5	3,4	3,68 ====	3,1	4,98	5,25 ====
Iode	202	215	225 ==	179	114	121 ==
Mercurochrome	45	52	60 ==	23	31	34 ==
Furadoïne	30	75	150 ==	3	4,75	6 =

Les valeurs données sont de l'ordre du milligramme par litre.

Essais portant sur Echerichia Coli

Milieux utilisés

- 1) Bouillon nutritif à l'extrait de viande
 - 2) Notre milieu semi-synthétique
 - 3) milieu de Monod
 - 4) Milieu de Lasseur.
-

Milieu de Lasseur, de formule suivante :

Asparagine	0,90	g
Glycérol	2,5	g
$\text{PO}_4^{\text{HK}}_2$	0,25	g
SO_4^{Mg}	0,50	g
CaCl_2	0,04	g
Sulfate ferreux	0,01	g
NaOH N/10	6	ml
eau distillée Q. S. P.	100	ml

C'est un milieu proposé pour la croissance du bacille pyocyanique, mais qui nous a fourni une culture très remarquable pour le Colibacille. Dans cette formule, l'asparagine est la source d'azote, le glycérol est la source de carbone, le Phosphate bipotassique apporte du phosphore et du potassium, et SO_4^{Mg} apporte du soufre et du magnésium.

Tableau n° 7

Concentrations bactériostatiques de différents anti-septiques vis-à-vis de E. Coli

Nombre de germes 1 million par ml. Culture de 24 H

	En bouillon nutritif			En milieu semi-synthétique			En milieu de Lasseur			En milieu de MONOD		
	24 H	48 H	72 H	24 H	48 H	72 H	24 H	48 H	72 H	24 H	48 H	72 H
Phénol	1150	1350	1520 =====	931	1046	1125 =====	741,3	869,2	919,2 =====	675	1050	1626 =====
Cl. de benzalkonium	8,7	9,2	10,12 =====	1,125	1,45	1,8 =====	0,125	0,25	0,253 =====	2,5	2,83	3,062 =====
Iode	406	418	425 =====	112,6	149,1	186 =====	20	28,2	33,06 =====	14,1	18,9	25 =====
Mercurochrome	30,2	33,6	35 =====	43,7	52,4	61,6 =====	0,4	1,3	2,52 =====	1,3	3,1	3,4 =====
Furadoïne	15,1	21,3	23,8 =====	3,9	5,6	7,29 =====	32,4	49,8	51,6 =====	1,2	3,9	6,48 =====

Les valeurs données sont de l'ordre du milligramme par litre.

Essais portant sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Milieux utilisés :

Ils sont au nombre de :

- 1) bouillon nutritif à l'extrait de viande
- 2) notre milieu semi-synthétique
- 3) milieu de Monod
- 4) milieu de Lasseur
- 5) milieu de Kossel
- 6) milieu de Gessard.

Le milieu liquide que Gessard a mis au point plus particulièrement pour la culture du Bacille pyocyanique, répond à la formule suivante :

Succinate d'ammonium	3 g
SO ₄ Mg	2,5 g
PO ₄ HK ₂	5 g
eau distillée Q.S.P.	1000 cc

ajusté à pH 7,2 (avec NaOH ou KOH) et stérilisé 20 minutes à 115°.

Le milieu liquide de Gessard a donné de bons résultats pour la détermination de l'activité bactériostatique de différents produits vis à vis du Bacille pyocyanique, mais il ne se prête pas à la culture normale d'autres espèces bactériennes que nous avons utilisées.

Tableau n° 8

Concentrations bactériostatiques à l'égard de *Pseudomonas aeruginosa* ;

Nombre de germes 1 million par ml. Culture de 24 H

	En bouillon nutritif			En milieu semi-synthétique			En milieu de Gessard		
	24 H	48 H	72 H	24 H	48 H	72 H	24 H	48 H	72 H
Phénol	456	1139	1500 =====	176,1	359	429,5 =====	234	923	1003 =====
Ch. de bèn- .zalkonium	74	216,4	250 =====	4,8	7,89	9,58 =====	13,6	22,3	24,75 =====
Iode	329,2	597	700 =====	34,8	48,7	66,4 =====	9,41	11,23	14,25 =====
Mercurio- chrome	19,4	28,6	34,58 =====	25,7	48,3	56,4 =====	0,41	0,58	0,687 =====
Furadoïne	187,5	425	475 =====	46,7	86,9	112,5 =====	16,4	21,3	23 =====

Les valeurs données sont de l'ordre du milligramme par litre.

Tableau n° 9

Concentrations bactériostatiques à l'égard de *Pseudomonas aeruginosa* ;

Nombre de germes 1 million par ml. Culture de 24 H

	En milieu de LASSEUR			En milieu de KOSSEL			En milieu de MONOD		
	24 H	48 H	72 H	24 H	48 H	72 H	24 H	48 H	72 H
Phénol	237	743	900 ===	182	632	980 ===	326	724	900,1 =====
Cl. de benzalkonium	7,5	16,05	18 ==	3,82	7,98	9,55 =====	6	15	31,25 =====
Iode	21,3	43,6	65 ==	1,88	6,35	8,25 =====	22,5	60,3	62,5 =====
Mercurochrome	4,85	8,96	10,6 =====	0,19	0,32	0,548 =====	1,2	1,82	2,2 =====
Furadoline	86,4	125	312,5 =====	104,3	253	337,5 =====	39,5	312,5	337,5 =====

Les valeurs données sont de l'ordre du milligramme par litre.

Influence de l'espèce microbienne sur la dose
bactériostatique des substances antibactériennes.

Milieu d'essai : semi-synthétique

Nombre de germes : 1 million par ml.

Culture de 24 H.

Résultats de 72 H.

Les valeurs données sont de l'ordre du milligramme
par litre.

Iode	Staphylococcus aureus	(gram +)	65,6
	Streptococcus faecalis	(gram +)	121
	B. Subtilis	(gram +)	152,4 (spore)
			145 (forme végétative)
	Pseudomonas aeruginosa	(gram -)	66,4
	Klebsiella Pneumoniae	(gram -)	150,3
	E. Coli	(gram -)	186

de cuivre	Staphylococcus aureus	(gram +)	2180
	Streptococcus faecalis	(gram +)	1450
	B. Subtilis	(gram +)	3080 (spore)
			1897 (forme végétative)
	Pseudomonas aeruginosa	(gram -)	670,6
	Klebsiella Pneumoniae	(gram -)	1106
	E. Coli	(gram -)	1960

Phénol

Staphylococcus aureus (gram +)	1023	
Streptococcus faecalis (gram +)	2300	1183 (spore)
B. Subtilis (gram +)		1162,5 (f. végétative)
Pseudomonas aeruginosa (gram -)	429,5	
Klebsiella Pneumoniae (gram -)	2395	
E. Coli (gram -)	1125	

trachlorophénol

Staphylococcus aureus (gram +)	225	
Streptococcus faecalis (gram +)	629	350 (spore)
B. Subtilis (gram +)		325 (forme végétative)
Pseudomonas aeruginosa (gram -)	97,5	
Klebsiella Pneumoniae (gram -)	395	
E. Coli (gram -)	225	

Quinosol

Staphylococcus aureus (gram +)	7,4	
Streptococcus faecalis (gram +)	82,5	57,5 (spore)
B. Subtilis (gram +)		30,82 (forme végétative)
Pseudomonas aeruginosa (gram -)	63,25	
Klebsiella Pneumoniae (gram -)	80,2	
E. Coli (gram -)	126	

chlorure de
Benzalkonium

Staphylococcus aureus (gram +)	0,328
Streptococcus faecalis(gram +)	5,25
B. Subtilis (gram +)	1,5 (spore)
	0,962
Pseudomonas aeruginosa (gram -)	9,58
Klebsiella Pneumoniae (gram -)	4,75
E. Coli (gram -)	1,8

Mercurochrome

Staphylococcus aureus (gram +)	55
Streptococcus faecalis(gram +)	34
B. Subtilis (gram +)	30,1 (spore)
	58,3 (forme végétative)
Pseudomonas aeruginosa (gram -)	56,4
Klebsiella Pneumoniae (gram -)	70
E. Coli	61,6

Merthiolate

Staphylococcus aureus (gram +)	0,4872
Streptococcus faecalis(gram +)	2,843
B. Subtilis (gram +)	1,75 (spore)
	1,73 (forme végétative)
Pseudomonas aeruginosa(gram -)	1,248
Klebsiella Pneumoniae (gram -)	1,8
E. Coli (gram -)	1,535

Aldéhyde formique	Staphylococcus aureus (gram +)	20
	Streptococcus faecalis (gram +)	39,1
	B. Subtilis (gram +)	77,5 (spore)
		43 (forme végétative)
	Pseudomonas aeruginosa (gram -)	20,75
	Klebsiella Pneumoniae (gram -)	40
	E. Coli (gram -)	29

acide borique	Staphylococcus aureus (gram +)	2520
	Streptococcus faecalis (gram +)	10875
	B. Subtilis (gram +)	9135 (spore)
		9130 (forme végétative)
	Pseudomonas aeruginosa (gram -)	5655
	Klebsiella Pneumoniae (gram -)	11745
	E. Coli (gram -)	8700

Furadofine	Staphylococcus aureus (gram +)	1,38
	Streptococcus faecalis (gram +)	6
	B. Subtilis (gram +)	5,62 (spore)
		3,61 (forme végétative)
	Pseudomonas aeruginosa (gram -)	112,5
	Klebsiella Pneumoniae (gram -)	2,916
	E. Coli (gram -)	7,29

Quelques exemples correspondant à l'influence de l'espèce microbienne et du milieu utilisé sur les concentrations bactériostatiques.

	Pseudomonas aeruginosa		Kl. Pneumoniae	
	bouillon nutritif	Milieu de Monod	bouillon nutritif	milieu de Monod
Merthiolate	27,25	0,0175	0,105	0,00175.
P. Chloro- phénol	325	250	262	137,5
Quinosol	437,5	237,5	45	11,5

	E. Coli		Staphylococcus aureus	
	bouillon nutritif	Milieu de Monod	Bouillon nutritif	Milieu de Monod
Merthiolate	0,474	0,0286	0,152	0,063
P. Chloro- phénol	285,4	356	524	426
Quinosol	60,4	25	3	3,75

Streptococcus
faecalis

B. Subtilis (spore)

Antiseptique mis en essai	Streptococcus faecalis		B. Subtilis (spore)	
	Bouillon nutritif	Milieu de Monod	Bouillon nutritif	Milieu de Monod
Merthiolate	0,175		0,665	0,051
P. Chloro- phénol	750	culture négative	525	506
Quinosol	6,1		3	1,5

Les chiffres donnés sont de l'ordre du milligramme
par litre.

conclusion

Dans cette partie de notre travail en utilisant les différents milieux, nous avons déterminé la dose bactériostatique des différentes substances antiseptiques à l'étude.

Nous avons constaté que dans presque tous les cas la dose obtenue à partir du bouillon nutritif est beaucoup plus élevée que celle obtenue en milieux synthétiques.

Les plus petites doses obtenues sont observées :

pour *E. Coli* dans les milieux de Lasseur et Monod
pour *Staphylococcus aureus* dans les milieux semi-synthétiques et Monod

pour *Pseudomonas aeruginosa* dans le milieu de Kossel

pour *Klebsiella Pneumoniae* en milieu de Monod

pour *B. Subtilis* en milieu de Kossel

pour *Streptococcus faecalis* ; en milieu semi-synthétique.

Nous avons observé que parfois les doses bactériostatiques obtenues à partir du phénol et du parachlorophénol sont plus faibles en bouillon qu'en milieu synthétique. On peut penser que certains constituants de milieu renforcent l'action.

Il y a lieu de rappeler que nous avons compté surtout sur les résultats obtenus après 72 heures, car les résultats obtenus avant 72 heures sont très variables.

II - Etude quantitative de la croissance bactérienne.

Phases de croissance

L'évolution d'une culture bactérienne comporte plusieurs phases (fig.)

Ce fait, établi par les travaux de Büchner et de Müller, et confirmé depuis par de nombreux auteurs (Hewerth, Wilson, Barber, Buchanan, Winslow, J. Régnier, R. David, S. Lambin, J. Monod, ...) permet d'établir une courbe de croissance traduisant l'évolution des cultures bactériennes.

On distingue schématiquement :

- a) une . . . dite "de latence", très brève, dont l'existence même est discutable, marquée par une accélération progressive du taux de croissance ;
- b) une phase de multiplication rapide à rythme constant ;
- c) une phase de multiplication ralentie conduisant progressivement à :
- d) une phase de maximum stationnaire, traduisant l'arrêt de la croissance ;
- e) une phase de déclin, se terminant par l'autolyse des bactéries.

1 - La période initiale (phase 1) succédant à l'ensemencement et durant généralement deux à trois heures en conditions optimales, est dénommée phase de latence, bien qu'elle

ne corresponde pas exactement à un état de repos.

Elle comporte en fait, deux étapes (Buchanan, 1918). Tout d'abord, les bactéries ne semblent pas manifester la faculté de se multiplier et le taux de croissance paraît nul. Cependant leur taille augmente. Elles peuvent donc synthétiser leurs constituants et s'enrichir en acides ribonucléiques. Il peut arriver que certaines des bactéries ensemencées s'autolysent, de telle sorte que la concentration en germes semble parfois diminuer (Müller). Il est extrêmement difficile de déceler ce qui se passe au sein d'une population bactérienne au tout début de la culture, car l'ensemencement aussi faible soit-il, apporte généralement des milliers ou des centaines de milliers de bactéries, les unes jeunes, les autres vieillissantes.

Dans une seconde phase, succédant rapidement à la première, la multiplication est décelable ; elle s'établit d'abord très lentement, avec un temps de génération prolongé ; puis le taux de croissance augmente progressivement, jusqu'à son maximum.

La phase dite "de latence" représente donc en fait le temps qui s'écoule entre le moment de l'ensemencement des bactéries et celui où elles se multiplient à vitesse maximale et constante.

La durée de cette phase initiale est influencée par de nombreux facteurs, parmi lesquels interviennent notamment, à côté de la température d'incubation, la constitution du milieu de culture. En milieux pauvres ou en milieux synthétiques, elle peut se prolonger pendant six, huit, vingt-quatre heures, car les bactéries doivent synthétiser de nouvelles enzymes.

L'état physiologique des bactéries, et l'âge des bac-

téries ensemencées conditionne largement l'apparition et la durée de cette phase.

2 - la phase de multiplication active dite phase logarithmique ou phase exponentielle.

Dans cette phase, les bactéries prolifèrent librement sans qu'aucun facteur ne limite leur multiplication.

Si l'on porte sur un graphique, en ordonnées, les nombres de germes présents, et en abscisses les heures de culture correspondantes, on obtient une courbe en S. Mais, en raison de l'étendue considérable de l'augmentation du nombre des bactéries, il est plus facile de porter en ordonnées les logarithmes des nombres de germes ou de la densité des cultures. On obtient alors une droite. Aussi le nom de phase logarithmique est-il attribué à cette période. La vitesse de croissance étant alors proportionnelle à la concentration en bactéries, on qualifie également cette période de phase exponentielle.

La phase exponentielle de culture est caractérisée par l'inclinaison de sa pente conditionnée, par le taux de croissance. Ce taux varie légèrement selon les bactéries, en conditions optimales, notamment selon leur faculté de synthétiser plus ou moins rapidement leurs acides ribonucléiques.

Pour une même bactérie, le temps moyen de génération augmente en fonction du nombre de bactéries ensemencées (J. Régnier et A. Kaplan). Tous les facteurs susceptibles de le modifier modifier l'influencent également, notamment la vitesse de pénétration des aliments à l'intérieur des cellules bactériennes, leur vitesse de conversion en matériel cellulaire. La vitesse de multiplication est, aussi largement conditionnée par la température d'incubation qui, entre certai-

nes limites (de + 20° C à + 40° C), peut doubler la vitesse des réactions biochimiques assurant la croissance et la multiplication, mais peut, au-delà de cette limite, inactiver les protéines enzymatiques.

3 - la phase de multiplication ralentie et de maximum stationnaire. Dès la 8ème ou 10ème heure de culture environ, la multiplication se ralentit. La progression du nombre de bactéries n'est plus géométrique, car le temps de génération devient de plus en plus long, et le taux de croissance diminue (phase 3).

Puis vient un moment, vers la 30ème heure de culture, où la multiplication semble s'arrêter, le nombre de bactéries viables a atteint son maximum et devient stationnaire. Le taux de croissance est nul. Si quelques bactéries continuent à se multiplier, leur nombre est compensé par la mort de certains autres. On dit que la culture a atteint la phase de maximum stationnaire (phase IV).

Dans un milieu riche, tel que le bouillon peptoné salé, ce maximum atteint 5 à 10 milliards de germes par centimètre cube parmi lesquels 3 milliards environ sont capables de se reproduire après transport sur un bouillon gélosé.

Ce maximum traduit le rendement de la croissance en fonction des éléments nutritifs du milieu, la croissance totale étant représentée par l'augmentation de la masse bactérienne par rapport à celle de l'ensemencement initial.

Sa détermination permet d'évaluer le rendement en fonction de la concentration des aliments ou de la présence dans le milieu, d'un aliment déterminé (glucide) et de sa concentration (J. Monod) (22).

4 - phase de déclin (phase V). Enfin la concentration en bactéries vivantes s'abaisse peu à peu du fait de l'autolyse d'une partie des germes dont la mort n'est plus compensée par la formation de cellules nouvelles.

Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer la limitation de la multiplication bactérienne qui peut être due à l'épuisement de certains éléments nutritifs ou à l'accumulation de déchets toxiques issus du métabolisme bactérien.

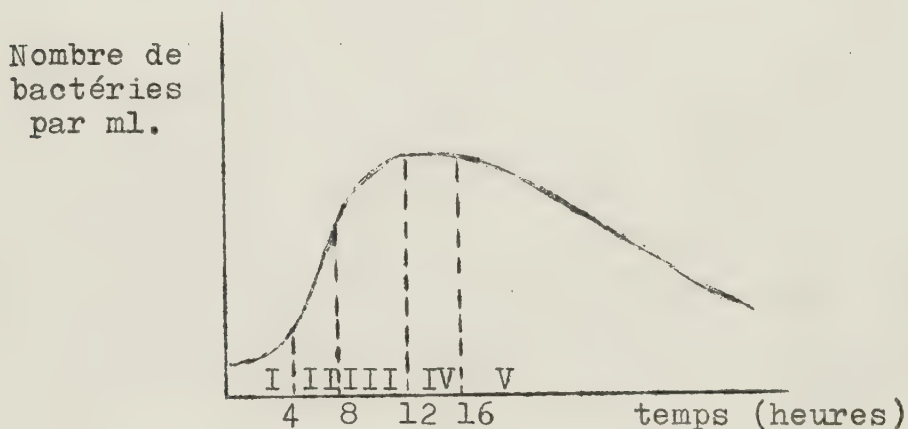


Fig. I : Phase de croissance d'une population bactérienne.

I - phase "de latence".

II - phase exponentielle.

III - Phase de multiplication ralentie.

IV - Phase de maximum stationnaire.

V - Phase de déclin.

Le Biophotomètre enregistreur.

Le biophotomètre enregistreur de Bonet-Maury et Jouan repose sur le principe suivant :

- un faisceau lumineux, provenant d'une forte lampe ponctuelle, est envoyé simultanément sur chacune des six cuves de culture placées dans une enceinte thermostatique. A la sortie de chaque cuve, le faisceau lumineux vient frapper une des six cellules à couche d'arrêt situées derrière les cuves.

- un galvanomètre enregistreur à 6 courbes est commuté automatiquement toutes les 20 secondes d'une cellule sur la suivante. Six diaphragmes, placés devant chacune des cuves, permettent le réglage indépendant de l'intensité traversant celles-ci.

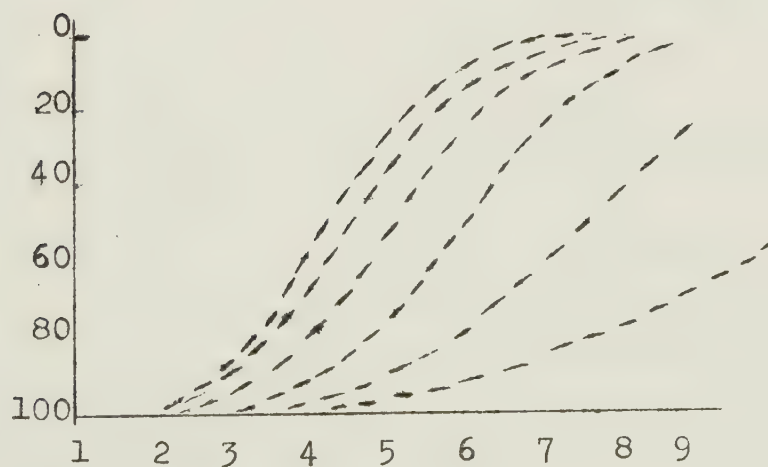


Fig. 2 : Exemple d'enregistrement au biophotomètre enregistreur de Bonet-Maury.

Analyse et interprétation des courbes de croissance bactérienne obtenues au biophotomètre enregistreur.

Comme l'ont montré de nombreux auteurs, en particulier Monod (22), qui fit une étude très détaillée de cette question, la croissance microbienne se fait selon un mécanisme relativement simple mis pour la première fois en évidence par Buchner .

Cet auteur porta son attention sur l'étude numérique de la multiplication bactérienne en se basant sur le fait qu'une cellule microbienne se multiplie par scissiparité, une bactérie se divisant en deux cellules égales. Connaissant le nombre de germes au début et à la fin d'une expérience, il est donc possible de calculer le nombre de divisions, c'est-à-dire de bipartitions, produites pendant la durée de l'expérience et, par suite, la durée d'une division, c'est-à-dire le temps d'une division ou temps de génération.

Soit :

N_0 = ensemencement initial = nombre de germes au temps $t = 0$.

N_t = nombre de germes au temps t .

n = nombre de divisions pendant ce temps t .

d = durée d'une division ou temps de génération.

Si nous décomposons la croissance pour chacune des bipartitions nous pouvons poser :

- après 1 bipartition il existe : $N_0 \times 2$ germes.
- après 2 bipartitions il existe : $N_0 \times 2 \times 2$ germes.
- après 3 bipartitions il existe : $N_0 \times 2 \times 2 \times 2$ germes.

- et après n bipartitions nous avons : $N_t = N_0 \times 2^n$

D'où l'on peut calculer :

$$n = \frac{\log. N_t - \log. N_0}{\log. 2}$$

Connaissant le temps t nécessaire pour obtenir ces n divisions, nous pouvons très facilement en déduire la durée d'une bipartition, c'est-à-dire le temps de génération d :

$$d = \frac{t}{n} = \frac{t \times \log. 2}{\log. N_t - \log. N_0}$$

Monod ajoute à ces caractéristiques la notion de taux de croissance ou nombre de divisions par heure :

$$\mu = \frac{60}{d}$$

Le biophotomètre enregistreur ne donne en fait qu'un enregistrement graphique dont les ordonnées correspondent à une échelle arbitraire (nombre de divisions du galvanomètre ou pourcentage de lumière transmise). Pour pouvoir appliquer les données précédentes à l'analyse des courbes obtenues il est donc nécessaire, comme l'a montré Bonet-Maury, de procéder à un étalonnage de l'appareil avec des suspensions bactériennes de titres connus, de telle sorte qu'on puisse traduire les divisions du galvanomètre en concentrations bactériennes N (nombre de germes par ml).

La numération des germes à différents moments de la croissance se pratique en répartissant d'une manière identique dans les six cuves de l'appareil le milieu de culture préalablement ensemencé à raison de 10^6 germes par ml (Staphylocoque doré ou Colibacille). Lorsque l'opacité dans l'une des cuves a atteint une division déterminée du galvanomètre enregistreur, cette cuve est retirée de l'appareil et le dénombrement des germes de la culture qu'elle contient est im-

médiatement effectué par la méthode opacimétrique à l'électrophotomètre de Meunier préalablement étalonné.

L'opération est pratiquée de la même manière pour chacune des six cuves à différents moments lorsque l'opacité de chacune d'elles atteint un certain chiffre de l'échelle arbitraire du galvanomètre.

Les moyennes obtenues au cours de plusieurs essais ont permis d'obtenir les tableaux de correspondance suivants (J. Bernard et J. Duchenne) :

- pour *Staphylococcus aureus* :

Divisions du galvanomètre (% de lumière transmise)	Nombre de germes correspondants	logarithme du nombre de germes
85	$7,5 \times 10^7$	7,87
70	$1,5 \times 10^8$	8,17
50	3×10^8	8,47
30	6×10^8	8,77
18	$1,2 \times 10^9$	9,07

- pour *Echerichia Coli* :

85	6×10^7	7,78
70	$1,2 \times 10^8$	8,08
52	$2,4 \times 10^8$	8,38
36	$4,8 \times 10^8$	8,68

Pour voir si la croissance se fait bien selon un rythme régulier exponentiel, il faut utiliser, non pas les ordonnées normales en nombre de germes par ml qui aboutissent à une courbe en S, mais des coordonnées semi-logarithmiques, en portant :

- en abscisses les temps de culture,
- en ordonnées les logarithmes des concentrations bactériennes.

Ces courbes, parfaitement rectilignes, prouvent que la

la croissance dans la partie enregistrée est bien exponentielle , qu'elle s'opère en progression géométrique.

Ce mode semi-logarithmique de représentation permet (Bonet-Maury et Perault) de voir comment s'effectue la croissance, dans la partie initiale non enregistrée de la croissance, c'est-à-dire dans ce qui correspond à la partie horizontale de l'enregistrement souvent considérée à tort comme une période de latence. Si l'on prolonge la droite obtenue en utilisant les coordonnées semi-logarithmiques, le prolongement coupe l'axe des ordonnées en un certain point ; or, ce point se confond avec le logarithme de la concentration initiale N_0 en germes (valeur de l'ensemencement) ou en est extrêmement proche. En d'autres termes, la courbe semi-logarithmique passe par l'origine. Ceci se retrouve aussi bien pour le Staphylocoque que pour le Colibacille pour un ensemencement initial N_0 de 10^6 germes par ml.

On peut conclure que le temps de latence n'existe pas ou, du moins, n'est que de très courte durée, ce qui confirme les constatations déjà faites par de nombreux auteurs (J. Régnier et A. Kaplan) et déjà signalé lors de l'étude de la multiplication bactérienne selon que la numération des germes se fait par numération microscopique ou sur plaque de gélose. "La période de latence observée par d'autres méthodes de numération que la photométrie doit correspondre, au moins en partie au temps nécessaire pour atteindre par prolifération à partir de N_0 le seuil de sensibilité de la méthode choisie" (Bonet-Maury).

De nombreux facteurs influencent la courbe de croissance obtenue au biophotomètre enregistreur notamment la température d'incubation, la grandeur de l'inoculum et la constitution du milieu (voir figures 6 à II).

II - Possibilités d'étude offertes par le Biophotomètre enregistreur.

Avant de commencer l'étude des modalités d'action des substances antiseptiques sur les courbes de croissance, nous allons étudier comment se traduisent sur l'enregistrement graphique obtenu, soit la croissance normale, soit l'évolution d'une culture après addition d'un agent antibactérien.

1 - Aspect des courbes de croissance.

A) courbe normale ou courbe témoin.

Dans un milieu nutritif suffisamment riche et à une température fixée à l'optimum (37° en général), la croissance d'un germe s'enregistre sous forme d'une courbe en S. Le retard apparent observé pour noter le départ de la courbe ne signifie nullement qu'il s'agisse là d'une "phase de latence", mais il est uniquement dû à la réponse retardée de l'appareil, c'est-à-dire à sa sensibilité. En effet, l'enregistrement ne commence à se faire que pour une certaine opacité minimum et la partie horizontale de la courbe représente le temps nécessaire pour que la culture présente une opacité enregistrable.

Après un certain temps, la courbe présente ensuite une partie linéaire correspondant à une partie de la phase logarithmique puis, la sensibilité des cellules photoélectriques diminuant ensuite progressivement, la courbe devient parallèle à l'axe des abscisses. Ce parallélisme s'observe au-delà d'une certaine opacité de la culture et ne représente en aucune façon la phase de maximum stationnaire mais la limite supérieure de sensibilité de l'appareil (voir fig. n°1)

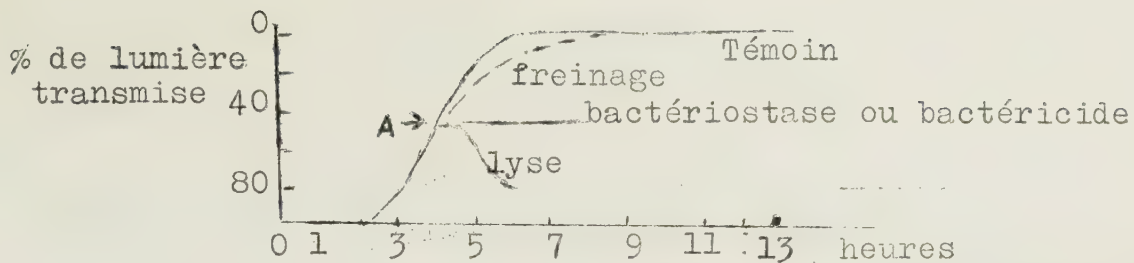


Fig. 3 : Actions antibactériennes mises en évidence au biophotomètre (addition de l'antiseptique A au départ de la culture.)
B) courbes obtenues en présence d'un agent antimicrobien.

L'aspect des courbes enregistrées sera différent selon que l'antiseptique est ajouté au départ de la culture ou au cours de celle-ci pendant la phase de multiplication logarithmique.

1) addition lors de l'ensemencement.

Nous pouvons observer les aspects suivants reproduits dans la figure N° 3:

- action freinatrice (bactériofreinatrice) : elle est due soit à l'allongement du temps de génération, soit à l'existence d'une phase de latence ;
- action bactériostatique ou bactéricide : elle se traduit par le fait que la courbe obtenue se confond tout le long de l'enregistrement avec l'axe des abscisses;
- action bactériolytique : observée notamment avec la pénicilline par Bonet-Maury (26), Lambin et Coll (71). Elle se traduit par un arrêt de la prolifération après quelques divisions, puis par une clarification du milieu (lyse).

2) addition de l'Antiseptique à une culture en phase de croissance.

Nous retrouvons dans ce cas les trois phénomènes précédents, mais ici l'action lytique est visible dès l'origine, ce

qui ne peut être mis en évidence par addition de l'agent antimicrobien au départ de la culture (fig. n° 4).

Par l'étude des courbes ainsi obtenues nous pourrions donc facilement mettre en évidence les modalités d'action d'une substance donnée aux doses sub-bactériostatiques ou supérieures, et les modifications observées permettront de voir à quel stade de la courbe de croissance normale agit l'inhibiteur bactérien.

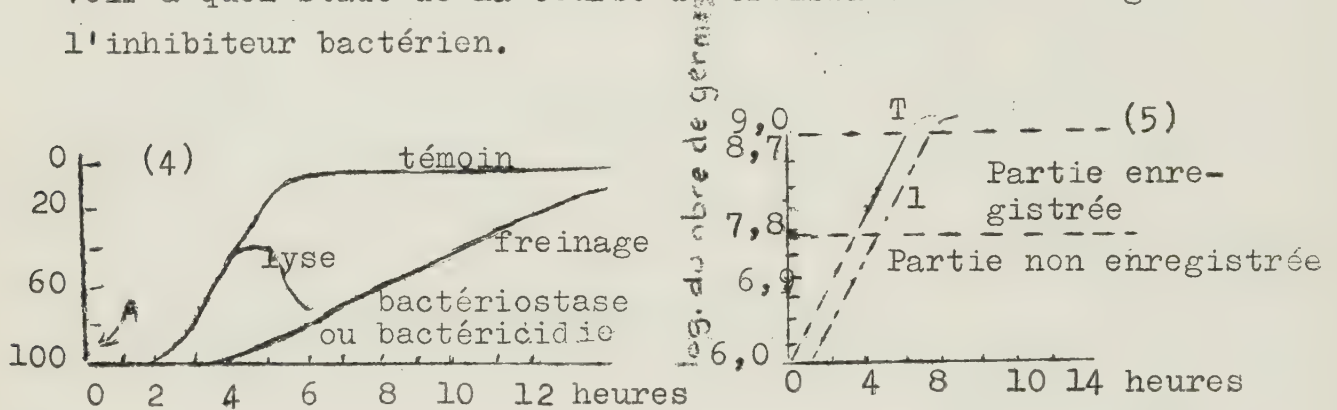


Fig. n° 4 : Action antibactérienne mise en évidence au biophotomètre (addition de l'antiseptique A au cours de la phase logarithmique).

Fig. 5 : Courbe de croissance en coordonnées semi-logarithmiques.

ESSAIS PERSONNELS

I - Influence du milieu de culture.

Avant d'entreprendre l'étude de l'action des substances antiseptiques sur les courbes de croissance, nous avons recherché l'effet sur ces courbes de la composition du milieu utilisé.

La température optimale que nous avons choisie est (+ 37 °C) qui convient à tous nos germes.

La concentration au départ était de 10 millions de germes par ml.

Les observations suivantes ont été réalisées :

A - Pour B. Subtilis (fig. n° 6)

Les milieux utilisés sont : le bouillon normal - le milieu de MONOD - notre milieu semi-synthétique et le milieu de Martin.

1 - En bouillon normal :

- le temps de latence est assez court (1 heure et demie à 2 heures)

- la phase de multiplication active est également très courte et en 45 minutes la courbe atteint son maximum (80 divisions du galvanomètre) mais tout de suite après, le phénomène de lyse commence. Quarante cinq minutes plus tard, le milieu s'éclaircit et la lumière transmise atteint 90 %, la formation de nouvelles bactéries commence, et à nouveau quand le milieu trouve une concentration égale à 80 divisions du galvanomètre, le lyse réapparaît, mais cette fois elle continue jusqu'à éclaircissement complet du milieu lequel reste définitivement clair.

2 - En milieu de MONOD.

- le temps de latence est très court et presque nul.

- la phase de multiplication active est assez longue et après 12 à 13 heures la croissance atteint son maximum (40 divisions du galvanomètre).

- la phase de multiplication ralentie dure de 6 à 7 heures

- le phénomène de lyse partielle apparait et l'éclaircissement du milieu se poursuit jusqu'à 65 divisions du galvanomètre.

3 - En milieu semi-synthétique :

- le temps de latence dure presque 2 heures.

- la phase de multiplication active dure 8 heures pour atteindre 85 divisions du galvanomètre.

- le phénomène de lyse apparait.

4 - En milieu de Martin.

- la période de latence est de 7 à 9 heures.

- la phase de multiplication active demande de 4 heures et demie pour atteindre une concentration correspondant à 60 divisions du galvanomètre. Ensuite se produit un phénomène de lyse complet. Lorsque le milieu est parfaitement clair, la formation de nouvelles bactéries apparait à nouveau, elle continue jusqu'à atteinte d'une opacité correspondant à 60 divisions du galvanomètre laquelle se maintient à ce taux.

B Pour E. Coli (fig. n° 7)

1 - En bouillon normal

- le temps de latence dure 1 heure et 15 minutes environ.

- le temps de multiplication active, 2 heures et demie. Après ce temps, il y a plus de $2,4 \times 10^8$ bactéries par ml du milieu (ce qui correspond à 46 divisions du galvanomètre).

- la phase de multiplication ralentie dure 4 heures, après quoi il y a formation de bactéries en quantité suffisante pour que l'opacité notée au galvanomètre corresponde à 10 divisions.

2 - En milieu de MONOD.

- le temps de latence est d'environ 8 heures

- la phase de multiplication active de 5 heures. Après ce temps, il y a plus de $4,8 \times 10^8$ bactéries par ml du milieu ce qui correspond à 30 divisions du galvanomètre.

- la période de multiplication ralentie est égale à 6 heures. Ensuite il y a un phénomène de lyse partiel, (éclaircissement du milieu jusqu'à 65 divisions du galvanomètre).

3 - En milieu semi-synthétique.

- la période de latence est de 4 heures

- la phase de multiplication active de 6 heures. Après ce temps il existe une quantité assez grande de bactéries, correspondant à 10 divisions du galvanomètre.

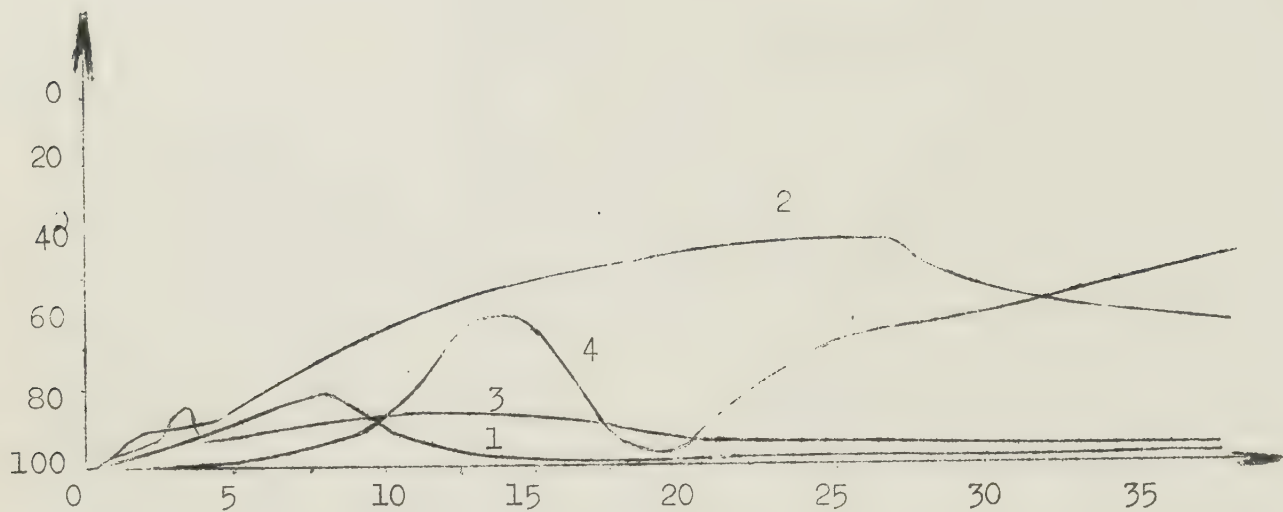


Fig. n° 6 : Courbe de croissance normale de *B. subtilis* (spore)
dans les milieux :

1' - bouillon peptoné salé 2 - milieu de Monod
3 - milieu semi-synthétique 4 - milieu de Martin

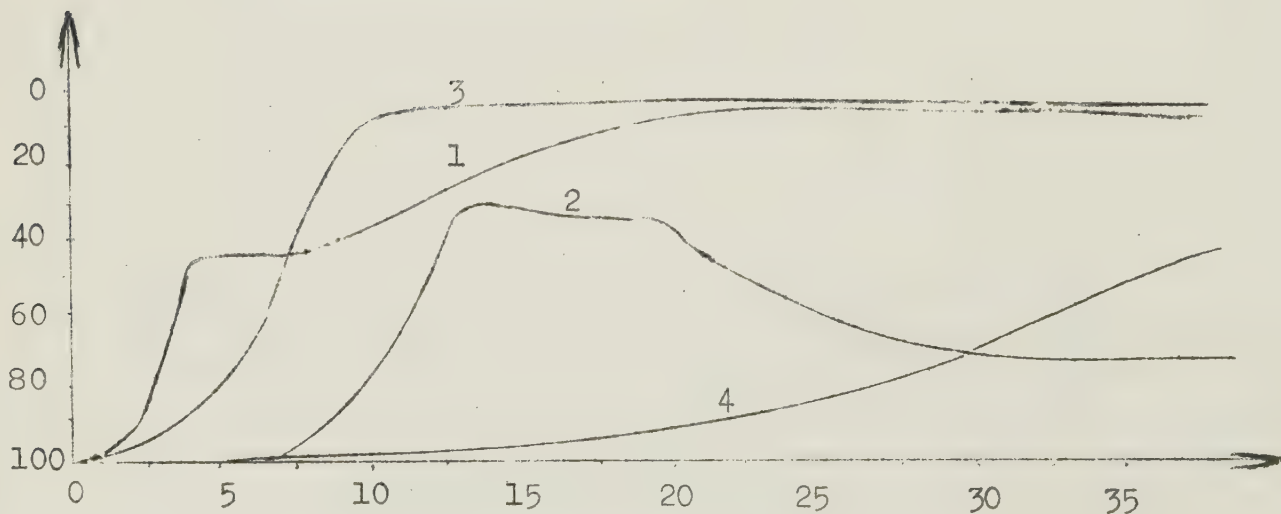


Fig n° 7 : Courbe de croissance normale de Colibacille en milieux :

1 - bouillon peptoné salé 2 - milieu de Monod
3 - milieu semi-synthétique 4 - milieu de Lasseur

4 - En milieu de Lasseur.

- le temps de latence est de 10 heures.
- la phase de multiplication active dure 38 heures ; après ce temps, il y a $4,8 \times 10^8$ bactéries par ml (correspondant à 36 divisions du galvanomètre).

C - Pour Pseudomonas aeruginosa (fig. n° 8)

1 - En bouillon normal.

- la phase de latence est de 2 heures et 15 minutes.
- la phase de multiplication active de 13 heures. Après ce temps la concentration en germes correspond à 46 divisions du galvanomètre.
- la phase de multiplication ralentie dure quelques heures, ensuite commence une nouvelle phase de multiplication active relativement lente qui dure 16 heures et donne une concentration en germes égale à 20 divisions du galvanomètre.

2 - En milieu de MONOD.

- le temps de latence est de 7 heures et 30 minutes.
- la phase de multiplication active atteint 33 heures, donnant une concentration maximum correspondant à 40 divisions du galvanomètre.

3 - En milieu de Gessard.

- le temps de latence est de 4 heures.
- la phase de multiplication active de 34 heures. Après ce temps la concentration en germes correspond à 60 divisions du galvanomètre.



Fig. n° 8 : Courbe de croissance normale de *B. pyocyaneus* dans les milieux :

- | | |
|---------------------------|-----------------------|
| 1 - bouillon peptoné salé | 2 - milieu de Monod |
| 3 - milieu de Cessard | 4 - milieu de Kossel. |
| 5 - milieu de Lasseur | |

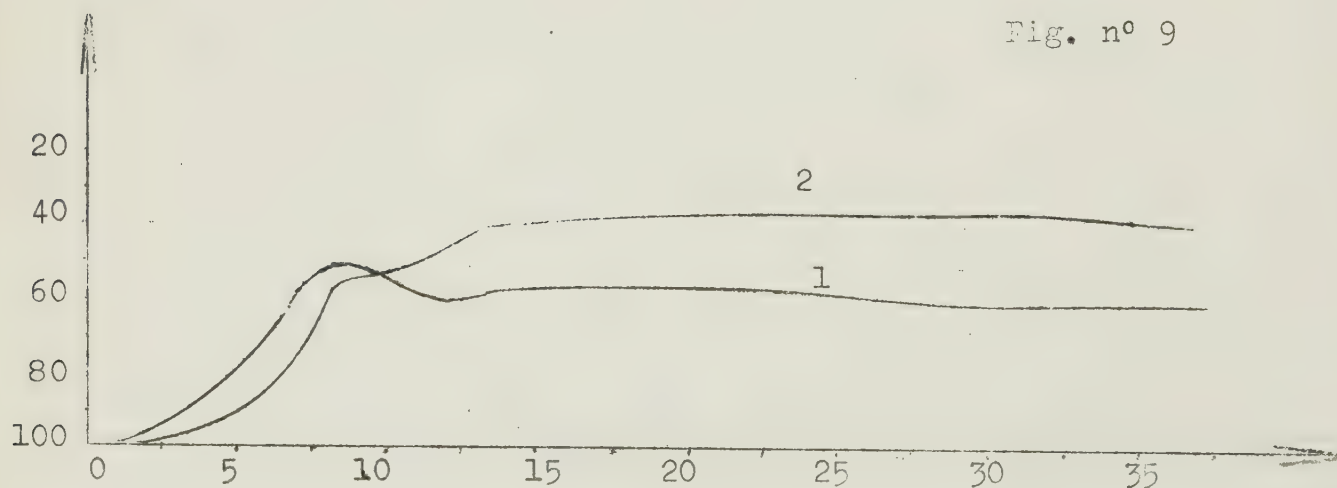


Fig. n° 9 : Courbe de croissance normale de l'*Enterococcus* dans les milieux :

- | |
|------------------------------|
| 1 - bouillon peptoné salé |
| 2 - milieu semi-synthétique. |

4 - En milieu de KOSSEL et Lasseur.

On observe la même évolution de la croissance que dans le milieu de Gessard.

5 - En milieu semi-synthétique.

- le temps de latence est de 12 heures.
- la phase de multiplication active de 36 heures. Après ce temps la concentration en germes correspond à 45 divisions du galvanomètre.

D - Pour le streptococcus faecalis (fig. n° 9)

1 - En bouillon normal :

- la phase de latence est de 2 heures.
- la période de multiplication active est de 5 heures. La concentration maximum en germes correspond à 55 divisions du galvanomètre.
- la phase de multiplication ralentie dure 3 heures. Après cette phase une partie des bactéries sont lysés et la lumière transmise atteint 60 %.

2 - En milieu semi-synthétique :

- la phase de latence est de 4 heures.
- la phase de multiplication active est de 4 heures 30 minutes. Après ce temps la concentration en germes correspond à 54 divisions du galvanomètre.

- la phase de multiplication ralentie dure 2 heures.

- une nouvelle phase de multiplication active survient et entraîne une concentration en germes correspondant à 40 divisions du galvanomètre.

E - Pour Klebsiella Pneumoniae (fig.10)

1 - En bouillon normale

- le temps de latence est de 2 heures et 30 minutes.

- la période de multiplication active de 14 heures. A la fin de cette période la concentration en germes correspond à 50 divisions du galvanomètre.

2 - En milieu semi-synthétique.

- le temps de latence est de 4 heures et 30 minutes.

- le temps de multiplication active de 14 heures. A la fin de cette période la concentration en germes correspond à 30 divisions du galvanomètre.

F - Pour Staphylococcus aureus (fig. n° 11)

1 - En bouillon normal.

- la phase de latence est de 2 heures 15 minutes.

- la phase de multiplication active de 3 heures. A la fin de cette phase il existe 3×10^8 bactéries par ml de milieu correspondant à 50 divisions du galvanomètre.

- la phase de multiplication ralentie dure 10 heures. A la fin de cette phase, il existe 6×10^8 bactéries par ml de milieu

2 - En milieu de MONOD.

- la période de latence dure 9 heures.

- la phase de multiplication active se poursuit lentement atteignant 21 heures. Après ce temps une concentration de $1,2 \times 10^9$ bactéries par ml de culture est atteinte.

3 - En milieu semi-synthétique.

- le temps de latence est de 7 heures.

- la phase de multiplication active de 60 heures.

A la fin de cette phase il existe un peu moins de $1,2 \times 10^9$ bactéries par ml de culture correspondant à 22 divisions du galvanomètre.

Fig. 10

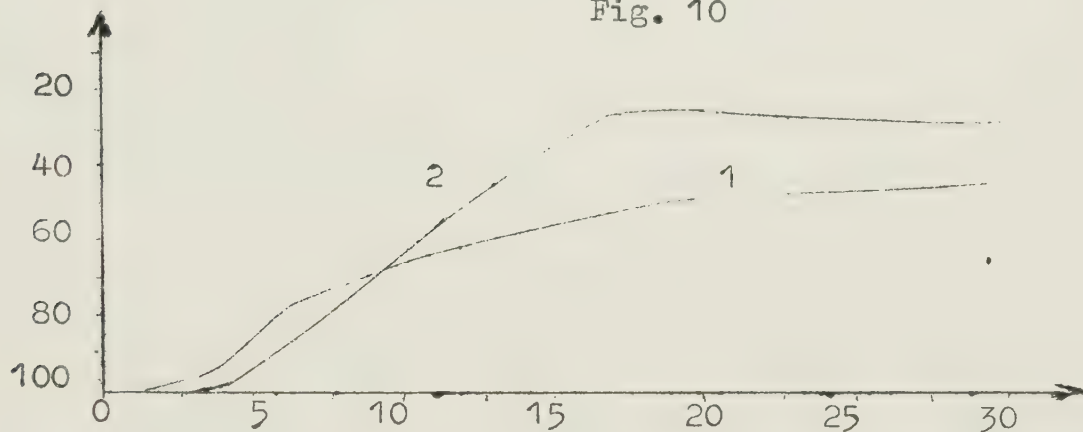


Fig. 10 : Courbe de croissance normale de *Klebsiella pneumoniae* dans les milieux :

1 - En bouillon peptoné salé 2 - En milieu semi-synthétique.

Fig. 11

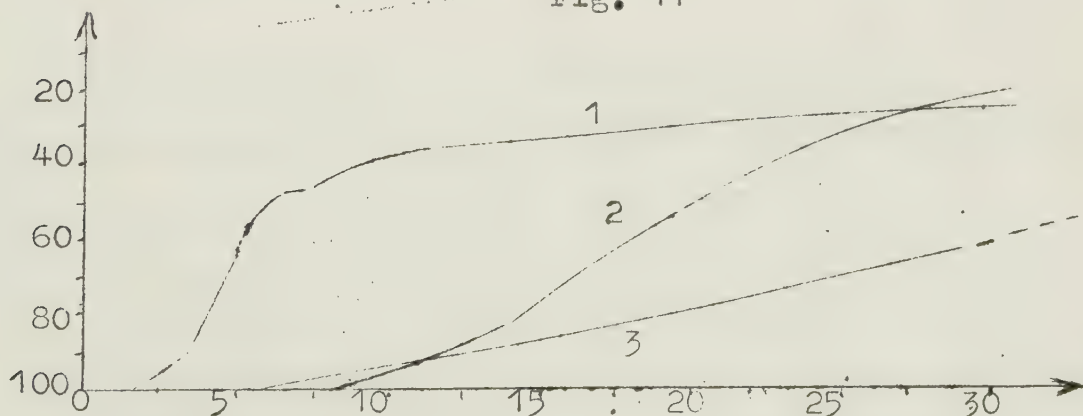


Fig. 11 : Courbe de croissance normale de *Staphylococcus aureus* dans les milieux :

1 - En bouillon peptoné salé.

2 - En milieu semi-synthétique.

II - Influence des antiseptiques sur les courbes de croissance de germes mis en essai.

Nous avons déterminé les doses bactériostatiques des substances à étudier dans le chapitre précédent ; dans cette partie, nous étudions l'action de doses sub-bactériostatiques de certains antiseptiques sur les courbes de croissance de ces bactéries.

Nous avons constaté, au cours de nos essais que les doses bactériostatiques montrées au biophotomètre sont toujours inférieures à celles déterminées par la méthode des dilutions.

Ceci avait déjà été constaté par Lambin (S) Bernard (J) et Duchème (J). Tous les conditions sont les mêmes, les seules variables sont les conditions d'aération, d'éclairement et l'agitation électromagnétique continue.

Nous donnons une courbe de croissance témoin et cinq autres courbes obtenues en présence de différentes concentrations sub-bactériostatiques d'antiseptiques.

A - Courbes de croissance obtenues par addition des antiseptiques au départ de la culture (fig. n° 12 à 19)

Les concentrations utilisés sont les suivantes :

Fig. n° 12	50	100	150	200	270 mg/litre
Fig. n° 13	80	160	240	300	356 mg/litre
Fig. n° 14	2	3,8	5,2	5,6	6 mg/litre
Fig. n° 15	0,8	1,5	2	2,5	3 mg/litre
Fig. n° 16	80	160	240	320	400 mg/litre
Fig. n° 17	45	90	135	225	300 mg/litre
Fig. n° 18	0,125	0,25	0,375	0,5	0,9 mg/litre
Fig. n° 19	0,04	0,08	0,14	0,2	mg/litre

Fig. n° 12

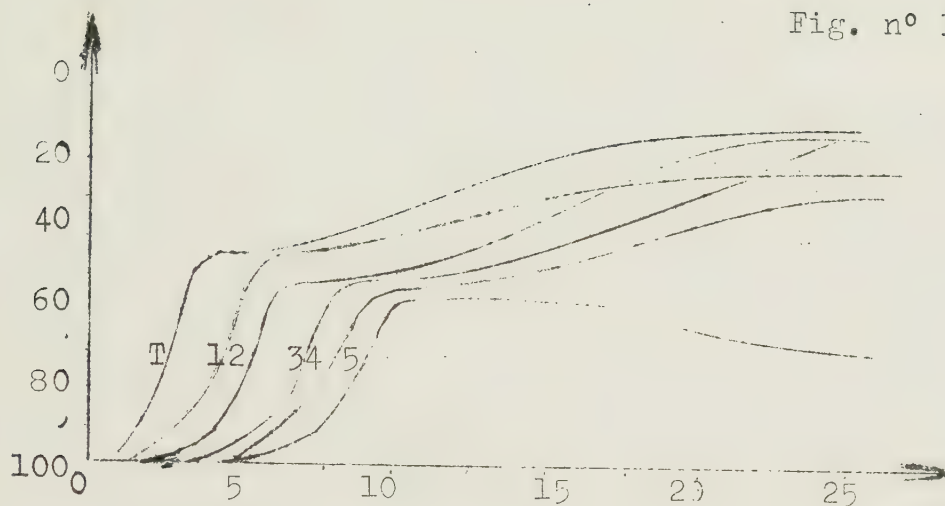
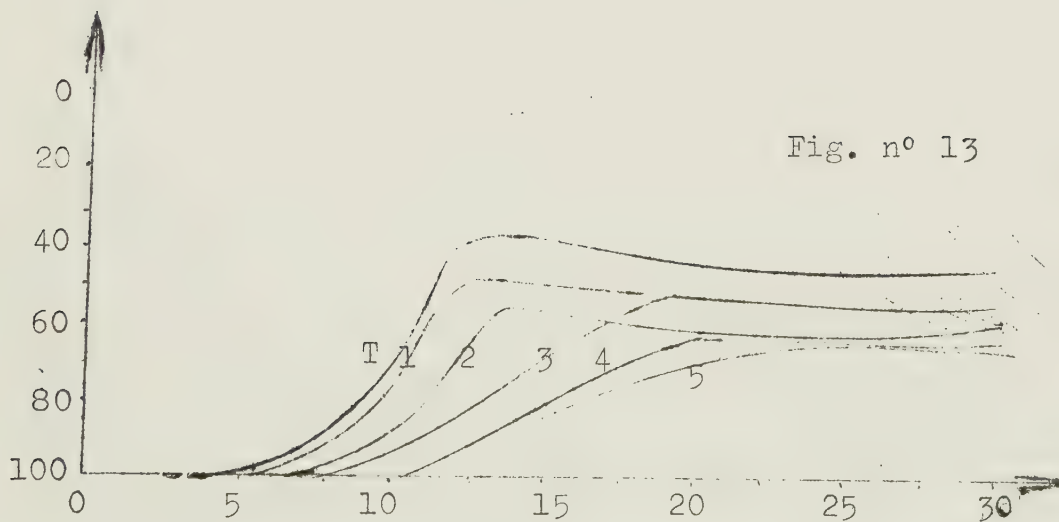


Fig. n° 13



Courbes de croissance de Colibaccille en présence de Para-chlorophénol. Antiseptique additionné lors de l'ensemencement.

Fig. n° 12 : en bouillon peptoné salé.

Fig. n° 13 : en milieu de Monod.

Fig. n° 14

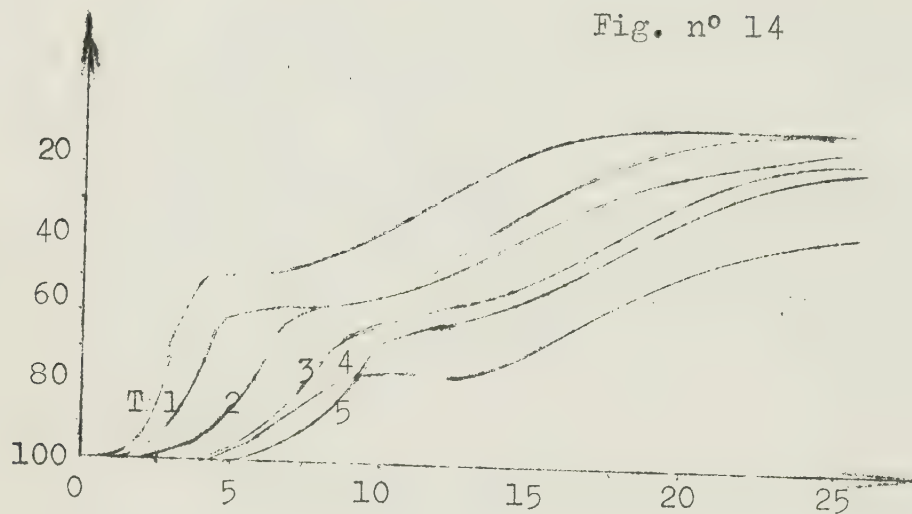
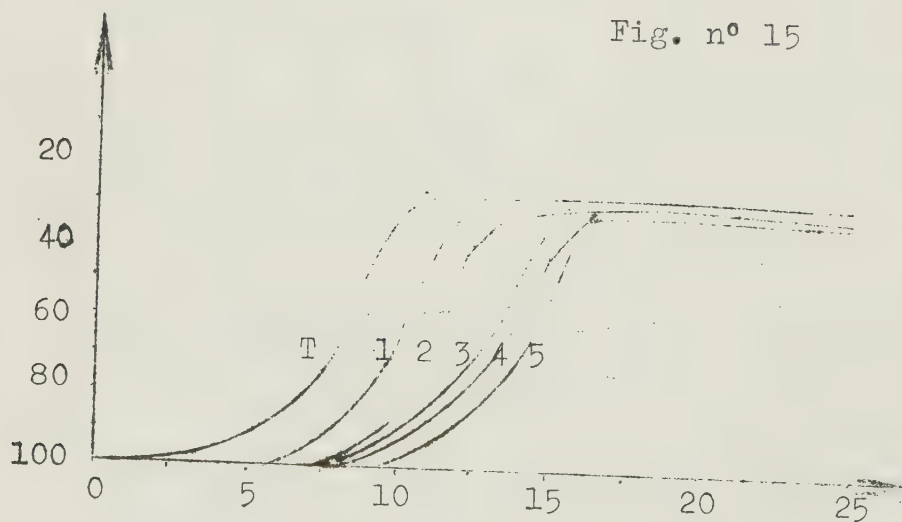


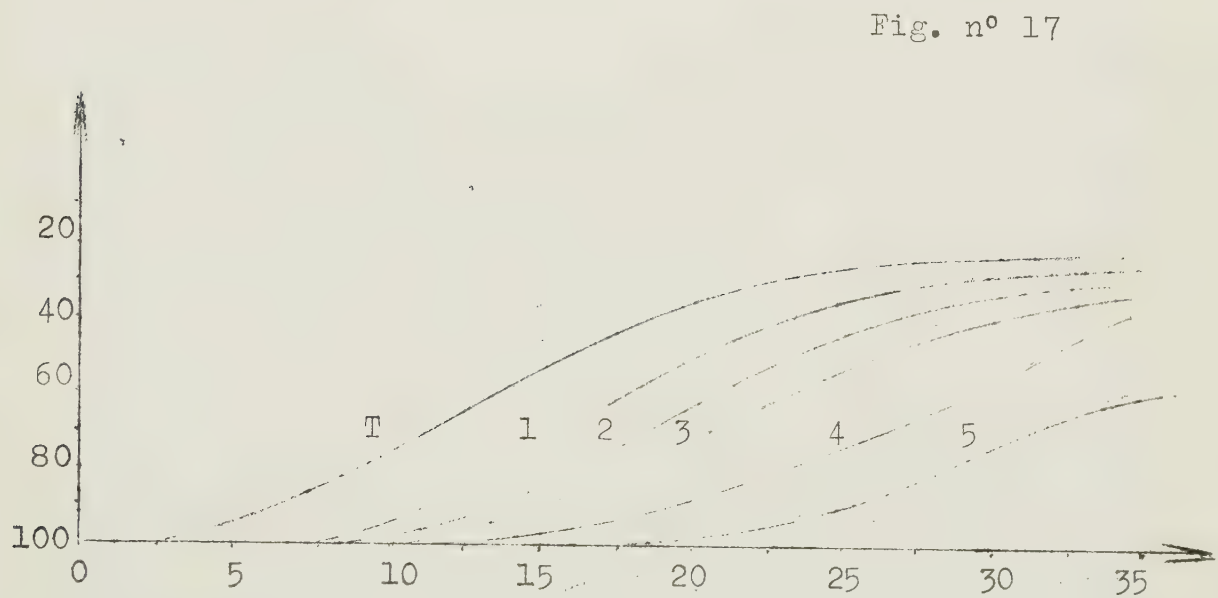
Fig. n° 15



Courbes de croissance de colibacille en présence de chlorure de Benzalkonium. Antiseptique additionné lors de l'ensemencement.

Fig. n° 14 : en milieu de bouillon peptoné salé.

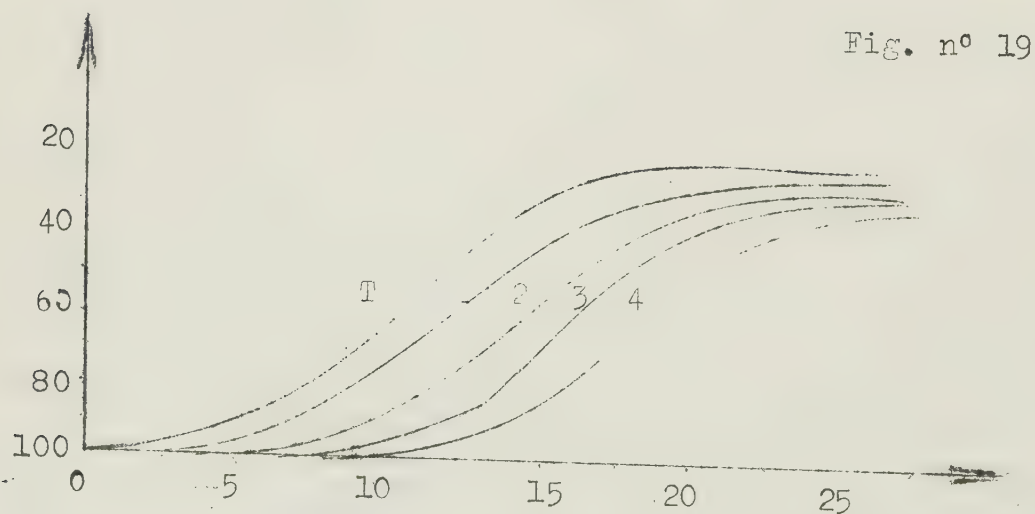
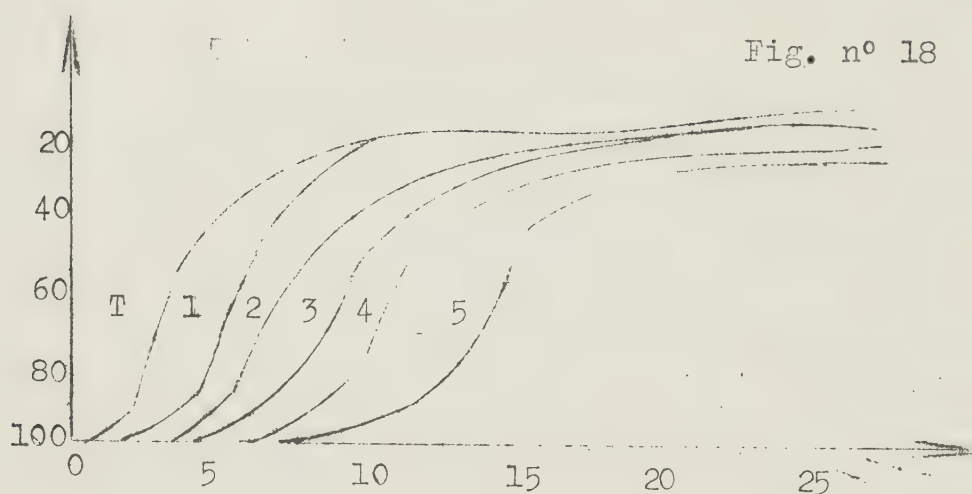
Fig. n° 15 : en milieu de Monod.



Courbes de croissance de *Staphylocoque* en présence de Para-chlorophénol. Antiseptique additionné lors de l'ensemencement.

Fig. n° 16 : en milieu bouillon peptoné salé.

Fig. n° 17 : en milieu de Monod.



Courbes de croissance de Staphylocoque en présence de chlorure de Benzalkonium. Antiseptique additionné lors de l'ensemencement.

Fig. n° 18: en milieu bouillon peptoné salé

Fig. n° 19 : en milieu de Monod.

B - Courbes de croissance obtenues par addition
des antiseptiques en phase de multiplication active.

Les concentrations utilisées sont les suivantes :

Fig. n° 20	50	100	150	200	250 mg/litre
Fig. n° 21	75	150	225	300	375 mg/litre
Fig. n° 22	1,2	2,4	3,6	4,8	8 mg/litre
Fig. n° 23	0,5	1	1,6	2,3	3 mg/litre
Fig. n° 24	40	120	200	280	400 mg/litre
Fig. n° 25	75	150	225	300	450 mg/litre
Fig. n° 26	0,2	0,4	0,6	0,8	1 mg/litre
Fig. n° 27	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6 mg/litre

Fig. n° 20

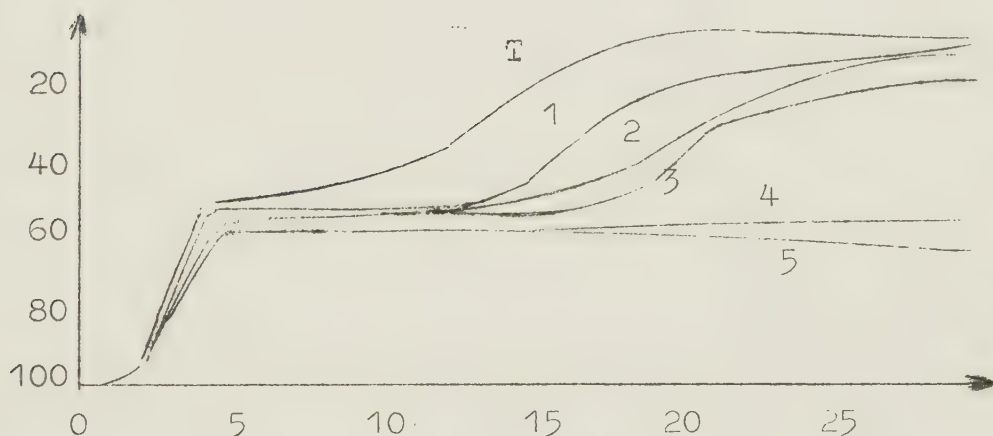
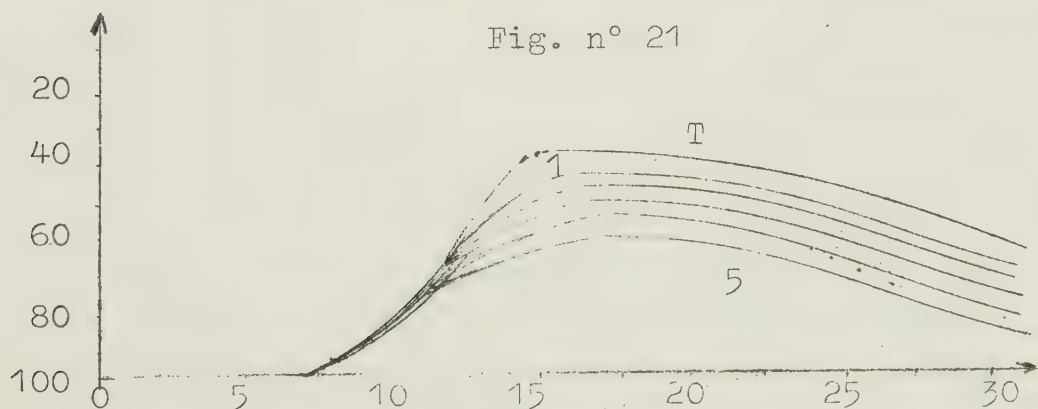
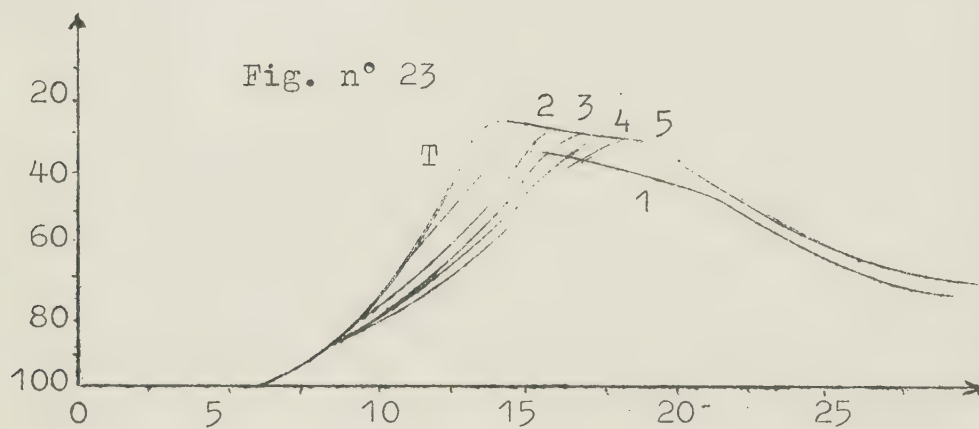
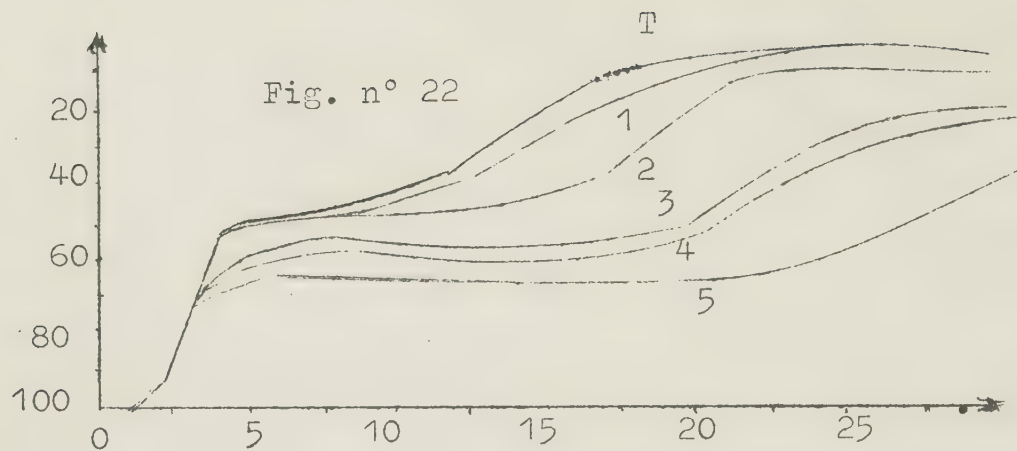


Fig. n° 21



Courbes de croissance de E. Coli en présence de para-
chlorophénol.

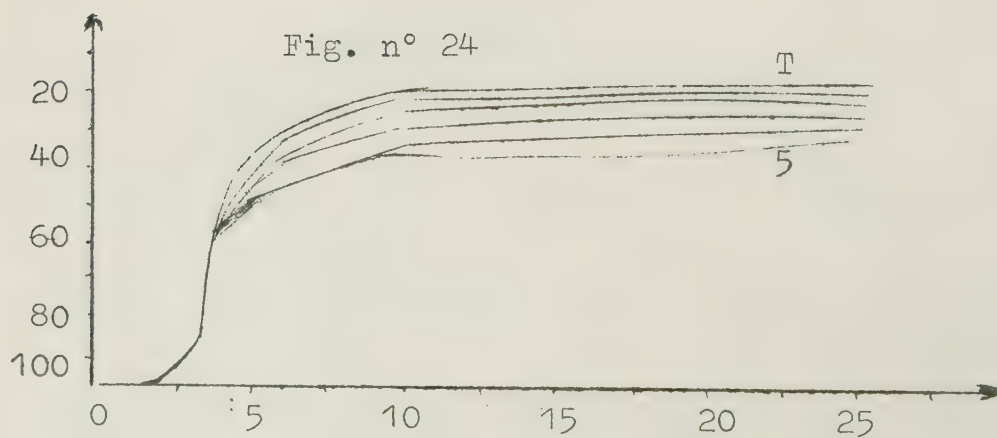
Fig. n° 20 : en bouillon normal. Fig. n° 21 : en mil de MONOD.

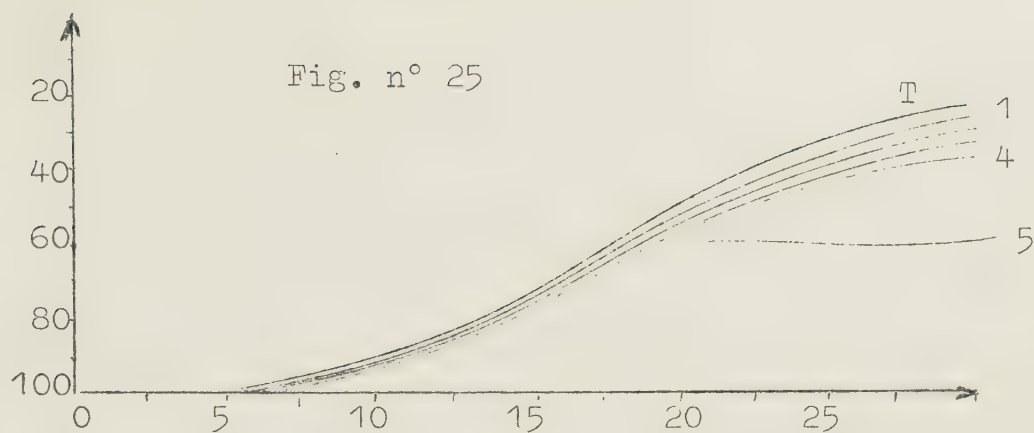


Courbes de croissance de *E. coli* en présence de Ch. de benzalkonium.

Fig. n° 22 : en bouillon normal

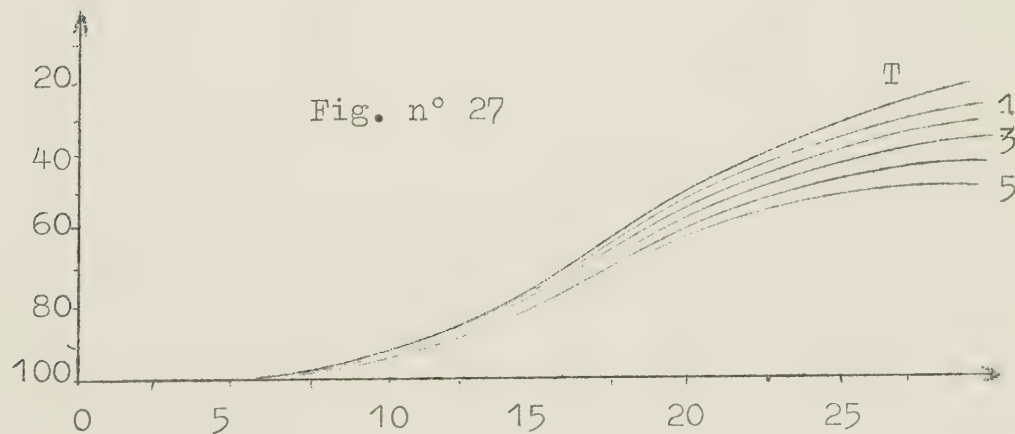
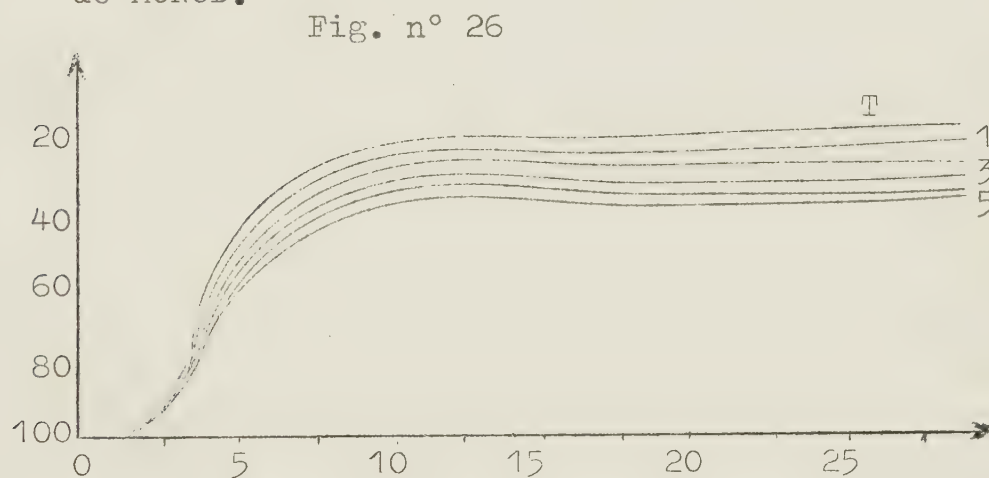
Fig. n° 23 : en milieu de MONOD.





Courbes de croissance de *St. aureus* en présence de parachlorophénol.

Fig. n° 24 : en bouillon normal. Fig. n° 25 : en milieu de MONOD.



Courbes de croissance de *St. aureus* en présence de Ch. de benzalkonium.

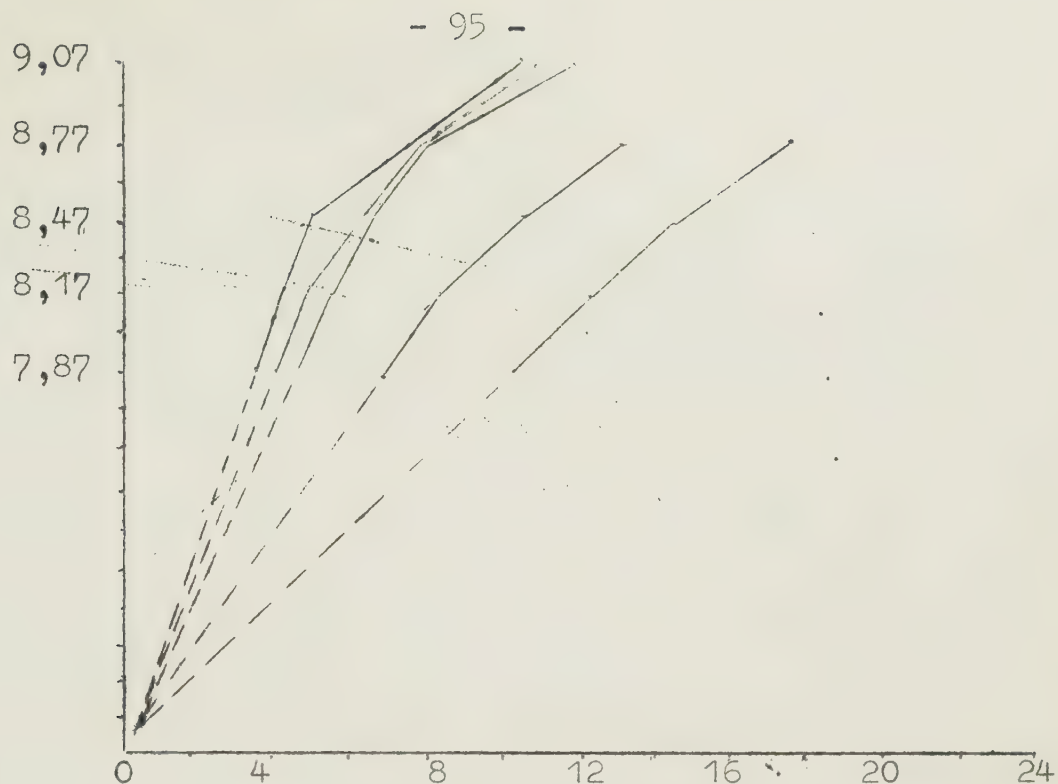
Fig. n° 26 : en bouillon normal.

Fig. n° 27 : en milieu de MONOD.

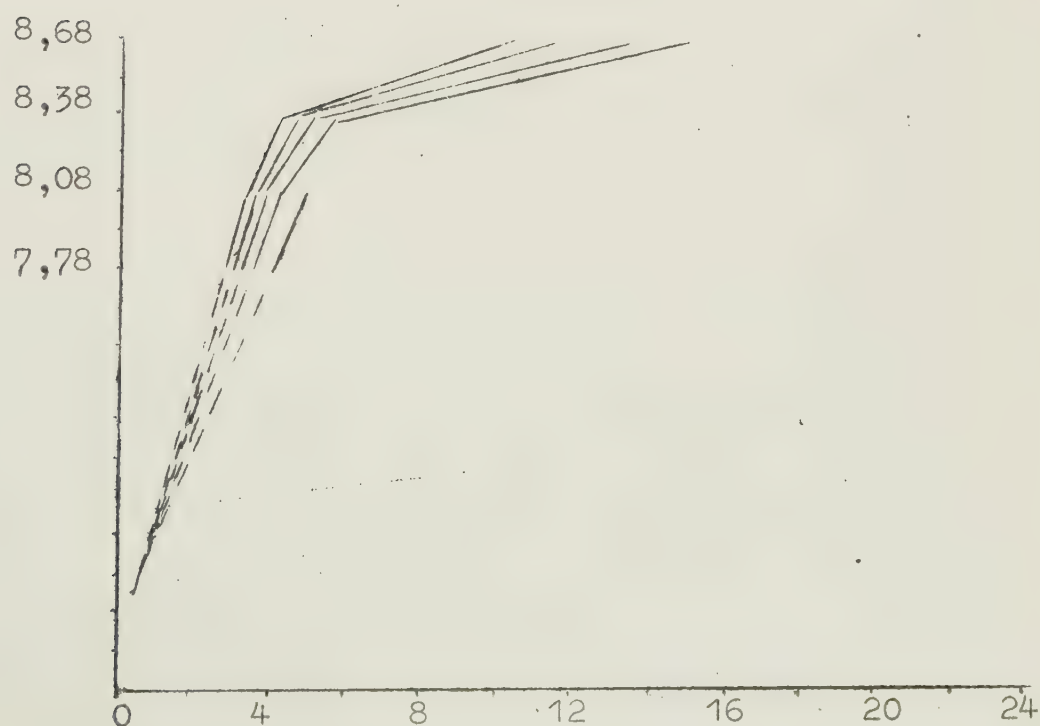
conclusion

Dans cette partie, nous avons étudié tous d'abord les courbes de croissance normale des germes mis en essai dans différents milieux utilisés. Nous avons observé que le temps de latence en milieu synthétique est beaucoup plus long qu'en bouillon ; nous avons observé également des variations dans les phases de multiplications actives.

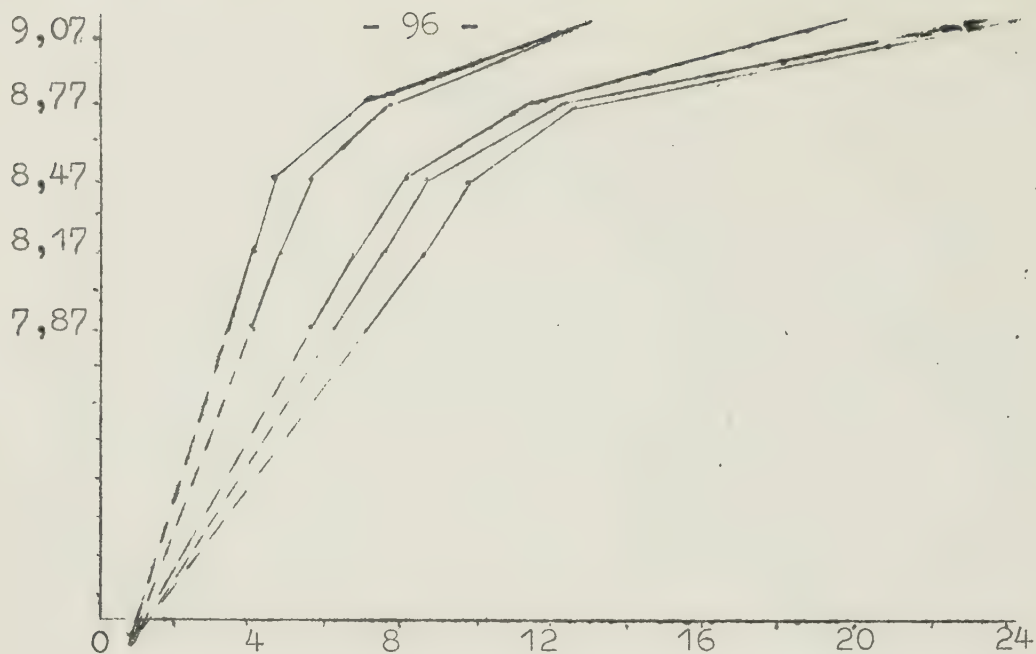
Cette recherche nous a permis dans la 2ème partie de ce travail d'étudier l'effet des antiseptiques sur les courbes de croissance.



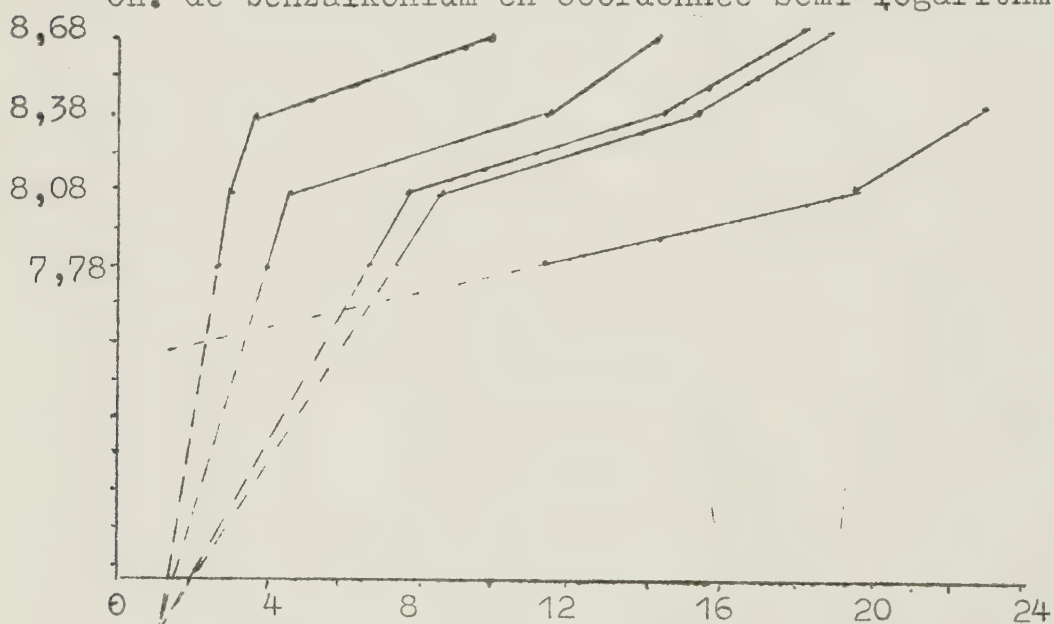
Courbe de croissance de *St. aureus* en présence de parachlorophénol en coordonnée semi-logarithmique.



Courbe de croissance de *E. Coli* en présence de parachlorophénol en coordonnée semi-logarithmique.



Courbe de croissance de *St. aureus* en présence de Ch. de benzalkonium en coordonnée semi-logarithmique.



Courbe de croissance de *E. Coli* en présence de Ch. de benzalkonium en coordonnée semi-logarithmique.

Si nous rapprochons nos résultats des conclusions apportées par (J) Duchenne (7), nous pouvons placer le parachlorophénol, et le Ch. de benzalkonium parmi les substances qui provoquent l'apparition d'une phase de latence réelle, ou apparente, et non parmi celles qui agissent en diminuant le taux de croissance exponentielle, ou en s'opposant à cette croissance exponentielle.

CONCLUSION GENERALE

Après avoir étudié comparativement la valeur de différents milieux synthétiques, préconisés pour la culture de diverses espèces bactériennes, nous avons adopté certains d'entre eux pour détermination de la dose bactériostatique de différentes substances mis en essai.

Nous avons tout d'abord utilisé la méthode des dilutions sériées ; ceci nous a permis d'observer un écart marqué entre les concentrations minima inhibitrices obtenues en bouillon et en milieux semi-synthétiques.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'influence du milieu sur la courbe de croissance des différentes espèces bactériennes mises en essai, puis nous avons étudié la modalité d'action de doses sub-bactériostatiques de certaines substances antibactériennes sur les courbes de croissance.

Nous avons ainsi pu observer des variations selon le milieu, dans la durée de la phase de latence, et dans la durée des temps de génération.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - Lambin (S) et German (A)
Précis de Microbiologie - Masson et Cie. 2e éd.,
Paris 1969.
- 2 - Lambin (S) et Desvignes (A).
Documentation sur les sciences naturelles appli-
quées à la Pharmacie.
Partie V - Chapitre IV - P. 71
Vigot éd., Paris. 1962
- 3 - Lambin (S), Bernard (J), Sébastien (F).
Influence du solvant sur l'activité bactério-
statique et bactéricide d'un antiseptique.
Ann. Pharm. Franc. 1952 - 20 - P. 328
- 4 - Lambin (S), German (A) et Desvignes (A)
De l'utilisation du biophotomètre enregistreur
pour le contrôle du titre en pénicilline de
préparation pharmaceutique.
Ann. Pharm. Franc. 1956 - 14 - P. 352
- 5 - Lambin (S)
Méthodes de mesure de l'activité antimicrobienne
des substances chimiques.
Thèse. Doct. Sciences. Paris (1933)
- 6 - Lambin (S) et Robert (M)
Influence de la concentration en bactéries sur
les résultats de l'essai in vitro des substances
antimicrobiennes.
Ann. Pharm. Franc. 1951 - 9 - P. 103

7 - Duchène (J)

Des modalités d'action des solvants organiques
sur l'évolution des courbes de croissance bac-
térienne.

Thèses. Doct. Etat en Pharm. Paris 1961

8 - Desvignes (A)

Contribution à l'étude de quelques facteurs
susceptibles, d'influencer la phagocytose des
bactéries.

Thèse. Doct. Pharm. (Etat), Paris 1952

9 - Baillie (A) and Gilbert (R. J.)

Auto mation, mechanization and data handling in
microbiologie.

Academic press. éd. London N. Y. 1970

10 - Rubbo (S. D.) and Gardner (J. F.)

A review of sterilization and disifection,
as applied to medical, industrial and labo-
ratory practice.

Lloyd. Luke éd., London 1965.

11 - Froelich (M)

Contribution à la culture d'un staphylocoque.
Préparation d'un milieu de choix synthétique.

Thèse. Doct. Pharm. Strasbourg 1948.

12 - Martin (J. P.)

Some observation on the synthesis of polysae-
charides by soil Bacteria.

J. Bact. 1945 - 50 - P. 349.

13 - Aubel (E)

Recherches biochimiques sur la nutrition du
B. pyocyanique.

Lanier, éd., Paris. 1921

- 14 - Cesar (R)
Influence de l'acide salifiant l'ammoniaque sur
le développement du B. pyocyanique, du Sac-
charomyces cerevisiae et de l'Aspergillus niger.
Thèse. Doct. Pharm. (Etat), Paris 1946.
- 15 - David (R)
Contribution à l'étude numérique de la multi-
plication du B. pyocyanique dans différents
milieux de culture liquides.
Thèse. Doct. Sci. Paris 1931.
- 16 - Gessard (C)
Essai sur la biologie du B. pyocyanique.
Ann. Inst. Past. 1902 - 16 - P. 313.
- 17 - Koser (S. A.)
Utilization of the salts of organic acids by
the colon Aerogenes - group.
J. Bact - 1923 - 8 - 495.
- 18 - Kaplan - Brille (A)
Influence du nombre des microbes ensemencés
sur la multiplication du bacille pyocyanique
dans un milieu de culture liquide.
Thèse. Doct. Pharm. Paris, 1931.
- 19 - Jund (Y)
De la morphologie et de la vitalité du coliba-
cille au cours de sa multiplication "in vitro".
Thèse. Doct. Pharm., Paris 1938.
- 20 - Iham-Cia-Huynh.
Contribution à l'étude numérique et pondérale
de la multiplication microbienne.
Etude des variations morphologiques des germes

au cours de la culture.

Thèse. Doct. Pharm. Paris 1947.

21 - Monod (J)

Sur une mutation spontanée affectant le pouvoir de synthèse de la méthionine chez une bactérie coliforme.

Ann. Inst. Past. 1946 - 72 - P. 879.

22 - Monod (J)

Recherches sur la croissance des cultures bactériennes.

Actualités scient. et ind., Hermann éd. Paris 1942.

23 - Ronchèse (A. M.)

La numération des bactéries et les divers modes de détermination quantitative de la richesse en germes des suspensions microbiennes.

Thèse. Doct. Pharm. Paris 1943.

24 - Tran Ngoc Tieng.

Contribution à l'étude des méthodes d'évaluation quantitative des bactéries.

Thèse. Doct. Pharm. Paris 1953.

25 - Faguet (M)

La photoélectricité dans l'enregistrement de la croissance.

Actualités scient. et indust. Hermann éd. Paris 1941.

26 - Bonet - Maury (P)

La Biophotométrie,
in : Sartory et Meyer.

Microbiologie pratique, Maloine, éd. 1950
P. 651.

27 - Benoist (D)

Contribution à l'étude des méthodes quantitatives en microbiologie. La méthode des dilutions appliquées à la pénicilline.
Thèse. Doct. Pharm. (Etat) Paris 1948.

28 - Gastinel (P)

Précis de bactériologie médicale
2e éd., Masson et Cie éd., 1953.

29 - Said (A)

Etude comparative de quelques méthodes de détermination de l'activité bactéricide in vitro.
Thèse. Doct. Pharm Paris 1959.

30 - Leluan (G)

Activité bactéricide de divers antiseptiques à l'égard de *Pseudomonas aeruginosa*.
Thèse. Doct. Pharm. Paris 1966

31 - Andrieu G, Monnier J et Bourse R.

La sensibilité du bacille pyocyanique aux agents antibactériens d'utilisation chimique.
Ann. Inst. Pasteur 1957; 92, 173 et 321

32 - Hadot (J. J.)

Modifications apportées à l'action antibiotique des sulfamides par leur association avec divers composés chimiques.
Thèse. Doct. Pharm. Nancy 1951

33 - Pouchol (J)

Effet de l'association d'un sulfamide et d'un phénol sur la croissance d'une bactérie (*E. Coli*)
Thèse. Doct. Pharm. Nancy 1950.

- 3⁴ - O' Meara (R. A. Q.) and Mc Sween (J.C.)
The failure of staphylococcus to grow from
small inocula in laboratory média.
J. Path. a. Bact. 1936, XLIII, P. 372.
- 35 - Brewer (C. M.)
Variations in phénol coefficients determination
of certains desinfectants.
Ann. J. Publ. Health 1943, 33 P. 261.
- 36 - Loo (H. Y) Skell (P. S.).
Essay of streptomycin by the paper-disc
plate methode.
J. Bact 1945, 50 - P. 701.
- 37 - Fox (S. W.), Fling (M) and Bollenback (G. N.)
Inhibition of bacterial growth by d- leucine
J. Biol. Chem, 1944, 155 P. 465.
- 38 - Richmond (M. H.)
The effect of aminoacid analogs on growth and
protein synthesis in microorganism
Bact. Rev., 1962, 26, P. 398.
- 39 - Pelezar (M. J.)
Ingredients for desinfectants testing.
J. Assoc. off. Agric. Chemists 1952, 25 P. 394
- 40 - Hirsch (M. L.) and Cohen (G. N.)
Amino acid utilisation in bacterial growth.
Biochem. J., 1953, 53, 25.
- 41 - Cook (A. M.) and Wills (B. A.)
The reproducibility of extinction time estimates.
Part I. variations in resistance of test organisms
and the viability of test suspensions.
J. Pharm. Pharmacol. 1956, 8, P. 266.

- 44 - Willett (N. P.) Morse (G. E.) Carlisle (Sh. A)
Requirements for growth of streptococcus agalactiae in
a chemically defined medium.
J. Bact. 1967 - 94 - P. 1247
- 45 - Ostrolenk (M) and Brewer (C. M.)
A bactericidal spectrum of some common organisms.
J. Am. Pharm. Assoc. Sc. Ed. 1949 - 38 - P. 95
- 46 - Ostrolenk (M)
Comparison of in vitro germicid test methods.
J. Am. Pharm. Assoc. Sc. Ed. 1950 - 39 - P. 71
- 47 - Yoshida (A) and Yamasaki (M).
Studies on the mechanism of protein synthesis in-
corporation of ethionine into alpha-amylase of
B. Subtilis.
J. Biol. Chem. 1959 - 34 - P. 158
- 48 - White (E. C)
Mercury Derivatives of phthaleins.
J. Am. Chem. Soc. 1920 - 42 - P. 2355
- 49 - Janacek (K) Chaloupka (J) Vires (H) Havranek (M)
Regulation of proteins synthesis in E. Coli by
aminoacid analogues.
Folia Microb. 1960 - 5 - P. 207
- 50 - Denoël (A)
Le mercurochrome N. D. Etude chimique et bactério-
logique.
J. Pharm. Belg. - 1940 - 22 - P. 423 et
1941 - 23 - P. 75.
- 51 - Albert (A), Rubbo (S. D) Coldacre (R. J) et Balbour (B. G)
The influence of chemical constitution on antibac-

terial activity. Part III. A study of 8 hydroxyquinoléine (oxine) and related compounds.

Brit. J. Exp. Path. - 1947 - 28 - P. 69

52 - Berry (H)

Review of disinfectants and disinfection.

J. Pharm. Pharmacol - 1951 - 3 - P. 689

53 - Carry (M) Bertoye (A) Viallier (J) et Courtieu (A. L)

Etude de la survivance des germes pathogènes après le traitement plus ou moins prolongé par différents corps mouillants, détergents et antiseptiques.

Premier Congrès mondial de détergence Paris 1954 -
P. P. 786-788.

54 - Chick (H)

The process of disinfection by chemical agencies and hot water.

J. Hyg. Camb - 1910 - 10 - P. 237.

55 - Cook (A. M) and Steel (K. J)

Effect of method of preparation of solutions.

Ph. and temperature upon oxidation of thioglycolate.

J. Pharm. Pharmacol - 1959 - 11 - P. 216.

56 - Cook (A. M) and Steel (K. J)

The antagonism of the antibacterial action of mercury compounds.

Part 1 - The antibacterial activity of mercuric chloride

J. Pharm. Pharmacol. - 1959 - 11 - P. 666.

57 - Delarue (J. L.)

Contribution à l'étude de l'essai d'activité in vivo des substances antiseptiques.

Thèse Doct. Pharmacie (Etat) - Paris 1958.

58 - Dony (J)

Considérations sur les épreuves de stérilité. Pharm.
Acta. Helv. - 1958 - 33 - PP. 10-

59 - Durin (M.)

Contribution à l'étude de la sensibilité, des bactéries à quelques antiseptiques modernes et antibiotiques de contact (antiseptogramme).
Thèse Doct. Pharm. (Lyon), Ment. - 1955.

60 - Eselteine (W. P. Van) and Rahn (O.)

The effect of temperature upon bacteriostasis.
J. Bact. 1949 - 57 - PP. 547

61 - Fildes (P)

The mechanism of antibacterial action of mercury.
Brit. J. Exp. Path - 1940 - 21 - PP. 67

62 - Goetz (A) and Tsuneishi

A new method for quantitative evaluation of inhibitory agents.
Bact. Proc. - 1955 - 55 - P. 43.

63 - Guegen (F)

Sur une méthode précise de détermination des pouvoirs antiseptiques.
C. R. Soc. Biol. - 1908 - 64 - P. 344.

64 - Kivella (E. W.) Malmann (W. L.) and Churchill (E. S.)

Physical action of surface active cation upon bacteria.
J. Bact. 1948 - 55 - PP. 565

65 - Mc Culloch (E. C.)

Disinfection and sterilization.
Lea et Febiger (Kimpton - London) 1945.

66 - Reddish (G. F.)

Methods of testing antiseptics.

Drug Markets, 1927, 20, PP. 495-530

67 - Reddish (G. F.)

Antiseptics. Disinfectants. Fungicides and chemical and
Physical stérilization.

Un vol. 841 pages, Kimpton, London. 1954.

68 - Sands (J. G.) Goers (L. A.), Bennett (E. O.)

The effect of agar on the inhibitory activity of Phenols.

Antonie V. Leeuwenhock, 1963, 29, PP. 386-397

69 - Videau (D)

Sur l'épreuve de stérilité des antibiotiques.

Ann. Pharm. Franc, 1952, 10, PP. 204

70 - Carrere (C)

Etude comparative du comportement de diverses souches
d'une même espèce bactérienne vis à vis de différents
agents inhiteurs. Thèse Dt. Pharm. Paris 1955

71 - Dittmer (K)

The structural bases of some amino-acid antagonists and
their microbiological properties.

Ann. N Y Acad. Sci - 1950 - 52 - 1274

72 - Vogel (H. J.) Davis (B. D.) Min Gioli (E. S.)

1 - histidinol, a precursor of L-histidine in E. Coli.

J. Am. Chem. Soc. 1951, 73, 2, 1897.

73 - Westley (J.) and Ceithami (J.)

Synthesis of histidine in E. Coli: 1 biochemical
mutant studies.

Arch. Bio Chem. Biophys. 1956, 60, P. 215.

Drug Market, 1947, p. 405.

67 - Reddish (D. A.)

Anticancerous activity of 1,2-dichloro-4-nitrobenzene and

physical properties.

Un vol. 24 pages, 1947, 1948.

68 - Sando (J. G.)

The effect of some on the toxicity, activity of phenols.

Antonie V. Leeuwenhoek, 1947, 24, 100-101.

69 - Videss (D.)

But response to fertility and antitoxins.

Ann. Pharm. Franc, 1947, 10, 404.

70 - Carrière (C.)

Étude comparative du comportement des chlorures sodés

d'une même espèce bactérienne vis-à-vis de différents

agents infectieux. Thèse Dr. Pharm. Paris 1947.

71 - Distat (K.)

The effect of 1,2-dichloro-4-nitrobenzene and

their physical properties.

(Ann. Pharm. Franc, 1947, 10, 404).

72 - Vol. 1 (A. A.)

1 - 1,2-dichloro-4-nitrobenzene and 1,2-dichloro-4-nitrobenzene in 1,2-dichloro-4-nitrobenzene.

J. A. Chem. Soc. 1947, 25, 4, 100.

73 - Westley (A.)

Physical properties of 1,2-dichloro-4-nitrobenzene and 1,2-dichloro-4-nitrobenzene.

Ann. Pharm. Franc, 1947, 10, 404.

(Ann. Pharm. Franc, 1947, 10, 404).

Ann. Pharm. Franc, 1947, 10, 404.

